

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GRECE APARECIDA SENHORINI

PARTÍCULAS DE PHBV OU ALGINATO DE SÓDIO CONTENDO O ATRAENTE
FLORAL *p*-DIMETOXIBENZENO E/OU CUCURBITACINAS: DESENVOLVIMENTO,
CARACTERIZAÇÃO E POTENCIAL APLICAÇÃO NO CONTROLE À PRAGA

Diabrotica speciosa

CURITIBA
2014

GRECE APARECIDA SENHORINI

PARTÍCULAS DE PHBV OU ALGINATO DE SÓDIO CONTENDO O ATRAENTE
FLORAL *p*-DIMETOXIBENZENO E/OU CUCURBITACINAS: DESENVOLVIMENTO,
CARACTERIZAÇÃO E POTENCIAL APLICAÇÃO NO CONTROLE À PRAGA
Diabrotica speciosa

Tese apresentada como requisito parcial a obtenção
do grau de Doutor em Química, no Curso em Pós-
Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas,
Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Sônia Faria Zawadzki
Co-orientador: Prof. Dr. Francisco de Assis Marques

CURITIBA
2014

S476p

Senhorini, Grece Aparecida

Partículas de PHBV ou alginato de sódio contendo o atraente floral p-Dimetoxibenzeno e/ou cucurbitacinas : desenvolvimento, caracterização e potenciais aplicação no controle à praga *Diabrotica speciosa*/ Grece Aparecida Senhorini. – Curitiba, 2014.

178 f. : il. color. ; 30 cm.

Tese - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-graduação em Química, 2014.

Orientador: Sônia Faria Zawadzki – Co-orientador: Francisco de Assis Marques.

Bibliografia: p. 165-178.

1. Polímeros. 2. Aditivos alimentares. 3. Cucurbitáceas - Doenças e pragas. 4. Crisomelídeo. I. Universidade Federal do Paraná. II. Zawadzki, Sônia Faria. III. Marques, Francisco de Assis. IV. Título.

CDD: 583.63

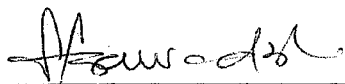
TERMO DE APROVAÇÃO

**PARTÍCULAS DE PHBV OU ALGINATO DE SÓDIO CONTENDO O ATRAENTE
FLORAL P-DIMETÓXIBENZENO E/OU EXTRATOS DE CUCURBITACINAS:
DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E POTENCIAL APLICAÇÃO NO CONTROLE
À *DIABROTICA SPECIOSA***

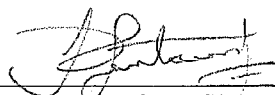
por

GRECE APARECIDA SENHORINI

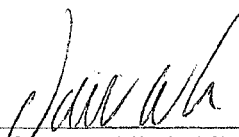
Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Química, pela Comissão Examinadora composta por:



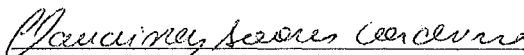
Prof.^a Dr.^a Sônia Faria Zawadzki
Orientadora
Dep. de Química – UFPR



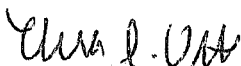
Prof. Dr. José Domingos Fontana
Dep. de Química e Biologia – UTFPR



Prof. Dr. Valdir Soldi
Dep. de Química – UFSC



Prof. Dr. Claudiney Soares Cordeiro
Dep. de Química – UFPR



Prof.^a Dr.^a Elisa Souza Orth
Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 25 de julho de 2014.

AGRADECIMENTOS

A Deus, aos meus padroeiros Nossa Senhora Aparecida e Santo Antônio por estarem sempre presentes em minha vida fortalecendo-me.

Aos professores Sônia Faria Zawadzki e Francisco de Assis Marques, pela transferência de seus conhecimentos, paciência, pela dedicação e amizade, que foram fundamentais para a concretização dessa tese de doutorado.

Ao professor Maurício Ursi Ventura (UEL), por contribuir, com a realização deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná que contribuíram, de alguma forma, para minha formação acadêmica desde o mestrado até agora no doutorado.

Aos funcionários e técnicos dos laboratórios do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná pelo apoio sempre que se fez necessário.

Aos colegas de laboratório e dos grupos de pesquisas vizinhos pela amizade e ajuda nos momentos que precisei. Em especial quero agradecer o Gustavo, Ricardo e Vinícius que me auxiliaram nos ensaios de aeração e nas análises por cromatografia em fase gasosa – espectrometria de massas.

Aos meus amigos Reinaldo, Thiago Alessandre, Débora e Laís pela ajuda e apoio profissional e pessoal em todos os momentos desse doutorado.

Aos meus pais pelo apoio moral e amor incondicional para continuidade dos meus estudos. Obrigada por sempre acreditarem no meu potencial e se orgulharem de mim.

Ao meu esposo, Eduardo Mayrhofer Sargi, pelo companheirismo, paciência, cumplicidade, amizade e principalmente amor incondicional e carinho nos momentos mais difíceis dessa longa caminhada. Obrigada por sempre acreditar no meu potencial e se orgulhar de mim.

À CAPES – REUNI pelo apoio financeiro.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica, em especial à Rosângela, pelas fotomicrografias obtidas. Ao Laboratório de Análise de Minerais e Rochas (LAMIR) pelas análises termogravimétricas (TGA) e de granulometria a laser. Ao Lactec pelas análises pelo método BET.

Aos membros da Banca pela contribuição ao participarem da defesa desta tese.

RESUMO

Poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV) e alginato de sódio, polímeros biodegradáveis e biocompatíveis, são interessantes do ponto de vista ambiental. Estes materiais foram utilizados na confecção de partículas e misturas físicas (filmes) contendo ou não o atraente floral *p*-dimetoxibenzeno (*p*-DMB). Extratos de cucurbitacinas foram preparados como forma de associá-los às partículas carregadas com o atraente floral, no desenvolvimento de tecnologia alternativa para potencial controle agrícola da *Diabrotica speciosa*. Emulsão seguida de evaporação do solvente orgânico, para o PHBV, e, emulsão seguida por geleificação iônica, para o alginato de sódio foram as metodologias aplicadas no preparo das partículas. Diversas técnicas foram utilizadas na caracterização dos materiais obtidos. Estudos de liberação *in vitro* foram avaliados por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). A determinação quali e quantitativa das cucurbitacinas foi efetuada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os resultados confirmaram que o *p*-DMB foi encapsulado e que sistemas de liberação foram elaborados. Nos extratos desenvolvidos, foi possível determinar a presença de cucurbitacinas.

Palavras-chave: PHBV, alginato de sódio, *p*-DMB, cucurbitacinas, *Diabrotica speciosa*.

ABSTRACT

Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) (PHBV) and sodium alginate, biodegradable and biocompatible polymers, are interesting of ambiental view point. These materials were utilized in the prepare of particles and physical mixture (films) containing or not *p*-dimetoxymethylene (*p*-DMB). Cucurbitacins extracts were prepared to partner the particles containing *p*-DMB, on developed of technology for *Diabrotica speciosa* potencial control. Emulsion/ Solvent evaporation, to PHBV, and, ionic gelling, to sodium alginate were the methodology applied on particles prepare. Several techniques were used on materials characterization. *In vitro* release studies were reviews by gas chromatography – mass spectrum (GC-MS). Quali and quantitative cucurbitacin analysis was realized by high pressure liquid chromatography (HPLC). Results confirmed that *p*-DMB was encapsulated and release systems were elaborated. In extracts was possible determine cucurbitacins.

Key-words: PHBV, sodium alginate, *p*-DMB, cucurbitacins, *Diabrotica speciosa*

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1.INTRODUÇÃO..... | 10 |
| 2.OBJETIVOS..... | 11 |
| 2.1. OBJETIVO GERAL | 11 |
| 2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 11 |
| 3.REVISÃO DE LITERATURA | 12 |
| 3.1. PHBV E SUAS APLICAÇÕES..... | 12 |
| 3.2.ALGINATOS E SUAS APLICAÇÕES..... | 17 |
| 3.3.SISTEMAS DE LIBERAÇÃO MODIFICADA DE MOLÉCULAS BIOATIVAS..... | 20 |
| 3.4. SEMIOQUÍMICO: <i>p</i> -DMB | 24 |
| 3.5. AS CUCURBITACINAS..... | 28 |
| 3.6. <i>DIABROTICA SPECIOSA</i> | 31 |
| 4.MATERIAIS E MÉTODOS | 33 |
| 4.1.REAGENTES E SOLVENTES | 33 |
| 4.2.EQUIPAMENTOS | 34 |
| 4.3.MÉTODOS | 35 |
| 4.3.1.Preparo de micropartículas de PHBV contendo o <i>p</i> -DMB, formuladas pelo método de emulsão simples/evaporação do solvente | 35 |
| 4.3.2.Preparo de misturas físicas (filmes) PHBV/ <i>p</i> -DMB | 36 |
| 4.3.3.Estudo da degradação química das micropartículas sem <i>p</i> -DMB | 37 |
| 4.3.4.Preparo das milipartículas de alginato de cálcio, sem otimização, contendo o <i>p</i> -DMB, formuladas pelo método de emulsão/geleificação externa..... | 38 |
| 4.3.5.Determinação do equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) do óleo de milho comercial, previamente ao preparo das milipartículas de alginato de cálcio otimizadas | 39 |
| 4.3.6.Preparo das milipartículas de alginato de cálcio, otimizadas, contendo o <i>p</i> -DMB, formuladas pelo método de emulsão/geleificação externa..... | 41 |

| | |
|---|----|
| 4.3.7.Preparo de misturas físicas alginato de sódio/ <i>p</i> -DMB..... | 41 |
| 4.3.8. Avaliação da estabilidade das emulsões, não otimizadas, no preparo das milipartículas de alginato de cálcio..... | 42 |
| 4.3.9.Testes de estabilidade e avaliação organoléptica das emulsões otimizadas . | 43 |
| 4.3.9.1. Testes de estabilidade acelerados a curto prazo | 43 |
| 4.3.9.2. Caracterização por microscopia ótica..... | 44 |
| 4.4.CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS E MISTURAS FÍSICAS DE PHBV E ALGINATO | 44 |
| 4.4.1.Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (IVTF) | 44 |
| 4.4.2.Análise de componentes principais (PCA) | 45 |
| 4.4.3.Difração de raios-X (DRX)..... | 45 |
| 4.4.4.Calorimetria exploratória diferencial (DSC) | 45 |
| 4.4.5.Análise termogravimétrica (TGA) | 47 |
| 4.4.6.Análise de área superficial e diâmetro de poros por meio do método BET | 47 |
| 4.4.7.Estudo morfológico e de superfície por microscopia eletrônica de varredura (MEV) | 48 |
| 4.4.8. Análise de tamanho de partícula por meio de granulometria a laser..... | 48 |
| 4.5.DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (%) DO <i>p</i> -DMB PARA AS PARTÍCULAS DE PHBV E ALGINATO: MÉTODO DIRETO E INDIRETO | 49 |
| 4.5.1.Método direto | 49 |
| 4.5.2.Método indireto..... | 51 |
| 4.6.ENSAIOS DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO <i>p</i> -DMB PARA PARTÍCULAS DE PHBV E ALGINATO..... | 52 |
| 4.6.1Cromatografia em fase gasosa – espectrometria de massas (CG- EM) | 53 |
| 4.7.PREPARO DE EXTRATOS A PARTIR DE PÓ DE PORONGO, CONTENDO CUCURBITACINAS | 54 |
| 4.7.1.Preparo das soluções estoque e padrão para cada extrato e determinação de cucurbitacinas | 55 |
| 4.7.2.Condições cromatográficas adotadas na determinação de cucurbitacinas | 56 |

| | |
|---|-----------|
| 5.RESULTADOS E DISCUSSÃO | 57 |
| 5.1. MICROPARTÍCULAS DE PHBV CARREGADAS COM <i>p</i> -DMB E SUA DEGRADAÇÃO QUÍMICA..... | 57 |
| 5.1.1.Preparo das micropartículas de PHBV pelo método de emulsão simples e evaporação do solvente | 57 |
| 5.1.2.Preparo das misturas físicas (filmes) PHBV/ <i>p</i> -DMB..... | 58 |
| 5.1.3.Avaliação das micropartículas de PHBV sem <i>p</i> -DMB após o processo de degradação química..... | 60 |
| 5.1.3.1.Análise por infravermelho com transformada de Fourier (IVTF)..... | 60 |
| 5.1.3.2.Medidas de cristalinidade por difração de raios-X (DRX) | 61 |
| 5.1.3.3.Análise térmica por calorimetria exploratória diferencial (DSC) | 62 |
| 5.1.3.4.Análise termogravimétrica (TGA) | 64 |
| 5.1.3.5.Efeitos da degradação na morfologia das micropartículas | 67 |
| 5.1.3.6.Perda de massa (avaliação gravimétrica) das amostras | 68 |
| 5.2.CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS DE PHBV E DAS MISTURAS FÍSICAS PHBV/ <i>p</i> -DMB | 69 |
| 5.2.1. Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (IVTF) | 69 |
| 5.2.2.Análise de componentes principais (PCA) aplicada aos espectros no infravermelho..... | 72 |
| 5.2.3.Difração de raios-X (DRX)..... | 75 |
| 5.2.4.Calorimetria exploratória diferencial (DSC) | 78 |
| 5.2.5.Análise termogravimétrica (TGA) | 83 |
| 5.2.6.Análise de área superficial e diâmetro de poros por meio do método BET | 88 |
| 5.2.7.Estudo morfológico e de superfície das micropartículas de PHBV por microscopia eletrônica de varredura (MEV) | 94 |
| 5.2.8.Estudo morfológico e de superfície das misturas físicas PHBV/ <i>p</i> -DMB por microscopia eletrônica de varredura (MEV) | 97 |
| 5.2.9. Análise de tamanho e partículas por meio de granulometria a laser | 99 |
| 5.3.DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DO <i>p</i> -DMB PARA AS MICROPARTÍCULAS DE PHBV: MÉTODOS DIRETO E INDIRETO | 101 |

| | |
|---|-----|
| 5.3.1. Método direto – determinação por espectrofotometria no ultravioleta e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)..... | 101 |
| 5.3.2. Método indireto – determinação por espectrofotometria no ultravioleta | 111 |
| 5.4. ESTUDO DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO <i>p</i> -DMB NAS PARTÍCULAS DE PHBV | 115 |
| 5.5. AS MILIPARTÍCULAS DE ALGINATO DE CÁLCIO SEM OTIMIZAÇÃO (SOT) E OTIMIZADAS (OT)..... | 121 |
| 5.5.1. As misturas físicas (filmes) alginato de sódio/ <i>p</i> -DMB (sem reticulação) com base nas formulações de milipartículas não otimizadas (sot) | 122 |
| 5.5.2. Determinação do EHL das emulsões contendo óleo de milho comercial: descoberta da emulsão estável (ideal)..... | 123 |
| 5.5.3. Testes de estabilidade acelerados a curto prazo e avaliação organoléptica das emulsões estáveis..... | 126 |
| 5.5.4. Avaliação das emulsões estáveis por meio de microscopia ótica | 128 |
| 5.5.5. Avaliação da estabilidade das emulsões para preparo das milipartículas de alginato de cálcio não otimizadas por microscopia ótica..... | 129 |
| 5.6. CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PARTÍCULAS DE ALGINATO..... | 131 |
| 5.6.1. Espectroscopia no infravermelho das amostras de partículas de alginato .. | 131 |
| 5.6.2. Análise de componentes principais (PCA) aplicada aos espectros no infravermelho das amostras de alginato..... | 134 |
| 5.6.3. Difração de raios-X (DRX) para as amostras contendo alginato | 137 |
| 5.6.4. Calorimetria exploratória diferencial (DSC) das formulações de alginato.... | 139 |
| 5.6.5. Análise termogravimétrica (TGA) das amostras de alginato | 143 |
| 5.6.6. Avaliação morfológica e de superfície das milipartículas de alginato de cálcio, sem e com otimização e das misturas físicas alginato de sódio/ <i>p</i> -DMB (filmes)... | 147 |
| 5.7. DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (EE%) PARA AS MILIPARTÍCULAS DE ALGINATO DE CÁLCIO: MÉTODO DIRETO E INDIRETO | 150 |
| 5.8. LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DAS MILIPARTÍCULAS DE ALGINATO DE CÁLCIO SEM (SOT) E COM OTIMIZAÇÃO (OT) | 152 |
| 5.9. EXTRATOS CONTENDO CUCURBITACINAS..... | 156 |
| 5.9.1. Determinação quali e quantitativa da cucurbitacina B dihidratada nos extratos | 157 |

| | |
|--------------------------|------------|
| 6.CONCLUSÃO | 162 |
| REFERÊNCIAS..... | 165 |

1. INTRODUÇÃO

A espécie *D. speciosa*, popularmente conhecida como vaquinha, é um inseto-praga que acomete, constantemente, diversas culturas agrícolas de grande importância para a agricultura brasileira. Esta praga prolifera-se, em seu estágio larval, nas raízes das plantas e, na fase adulta, destroe as folhas, comprometendo, desta forma, o estágio de desenvolvimento e maturação das culturas.

Atualmente o controle desta espécie é realizado pelo uso indiscriminado de pesticidas sintéticos do tipo carbamato, responsáveis por problemas ambientais como poluição das águas superficiais e subterrâneas, e contaminação dos solos e por problemas de saúde causados nos seres humanos.

Uma forma de diminuir os problemas ambientais e de saúde proporcionados pelo uso destes pesticidas, é desenvolver métodos alternativos de controle para a *D. speciosa*. Um método proposto, e hoje em dia já testado, é a confecção de armadilhas contendo produtos naturais com propriedades de atração, frente à espécie em questão *p*-DMB em associação com substâncias fagoestimulantes (cucurbitacinas).

O uso destes produtos naturais não descarta a utilização dos pesticidas sintéticos carbamatos, mas será responsável pela redução da frequência de aplicações por meio do poder de atração do *p*-DMB, capaz de atrair a praga em questão, à uma área limitada, que não venha comprometer a plantação como um todo. E a atividade fagoestimulante das cucurbitacinas, quando misturadas com os carbamatos, estimulará a espécie *D. speciosa*, ingerir ambos os compostos.

Pelo fato do *p*-DMB ser volátil, a sua incorporação em sistemas poliméricos biodegradáveis, na forma de partículas, reduzirá possíveis processos de volatilização e minimizará a poluição ambiental. Além disso, haverá economia em sua aplicação no controle da praga, já que é um composto orgânico de custo elevado.

2.OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver, caracterizar e avaliar a eficácia de partículas poliméricas carregadas com *p*-DMB em associação com extratos contendo cucurbitacinas, visando o controle populacional de *D. speciosa*.

2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar extratos de cucurbitacinas, identificar e quantificar o teor dessas substâncias.
- Preparar e caracterizar as micropartículas contendo *p*-DMB, utilizando um polímero sintético e um natural, por meio de técnicas como espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (IVTF), difração de raios-X (DRX), calorimetria exploratória diferencial (DSC), análise termogravimétrica (TGA), análise granulométrica e microscopia eletrônica de varredura (MEV).
- Determinar quali e quantitativamente o teor de *p*-DMB incorporado nas micropartículas por meio de espectrofotometria na região do ultravioleta e visível (UV-Vis).
- Determinar o perfil de liberação *in vitro* do *p*-DMB encapsulado por meio de cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas.
- Contribuir para o desenvolvimento de metodologia para o controle de importante praga agrícola minimizando a utilização de pesticidas altamente tóxicos e pouco seletivos.

3.REVISÃO DE LITERATURA

3.1. PHBV E SUAS APLICAÇÕES

O PHBV, poliéster produzido por cepas bacterianas, é biodegradável e biocompatível. Pertence à classe dos poli(hidroxialcanoatos) (PHAs), sendo constituído por dois monômeros, o ácido hidroxibutírico e o ácido hidroxivalérico, portanto, é classificado como um copolímero do poli(hidroxibutirato) (PHB). Suas propriedades mecânicas, térmicas, de biocompatibilidade e biodegradabilidade diferem das relatadas para o homopolímero PHB devido ao teor de unidades hidroxivalerato presentes em sua estrutura polimérica (LI *et al.*, 2014).

A porcentagem de unidades valerato incorporadas são dependentes dos tipos de cepas bacterianas (vias metabólicas que possuem) e substratos (fonte de carbono) utilizados na síntese microbiana. *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas oleovorans* e culturas bacterianas recombinantes de *Alcaligenes eutrophus* e *Escherichia coli* são as principais espécies responsáveis pela produção do PHBV e do PHB (Salehizadeh e Van loosdrecht, 2004). Sabe-se que estes polímeros são acumulados no meio intracelular, na forma de grânulos, (FIGURA 1) que são usados como fonte de carbono e energia para esses micro-organismos. Os produtos, resultantes da fermentação microbiana dos substratos utilizados, são gerados com características diferenciadas entre si (CHANDRA e RUSTGI, 1998).



FIGURA 1 – FOTOMICROGRAFIA DE CEPA BACTERIANA CONTENDO EM SEU MEIO INTRACELULAR GRÂNULOS DE POLI(HIDROXIALCANOATOS) (PHAS)
(FONTE: DA SILVA *et al.*,2007)

A partir de diferentes substratos (fonte de carbono oferecida para a bactéria), os micro-organismos podem gerar o intermediário hidroxilacil-CoA que será reconhecido e polimerizado pela enzima PHA sintase, gerando, desta forma, diversas classes de PHAs (FIGURA 2). Os PHAs podem ser divididos em duas classes com relação às suas unidades repetitivas (meros): os de cadeia curta (de 3 a 5 átomos de carbono) e os de cadeia média (de 6 a 14 átomos de carbono), que se diferenciam também entre si pelas propriedades apresentadas. Enquanto os PHAs de cadeia curta possuem características termoplásticas, os de cadeia média são considerados elastômeros, o que torna suas aplicações bem diferenciadas.

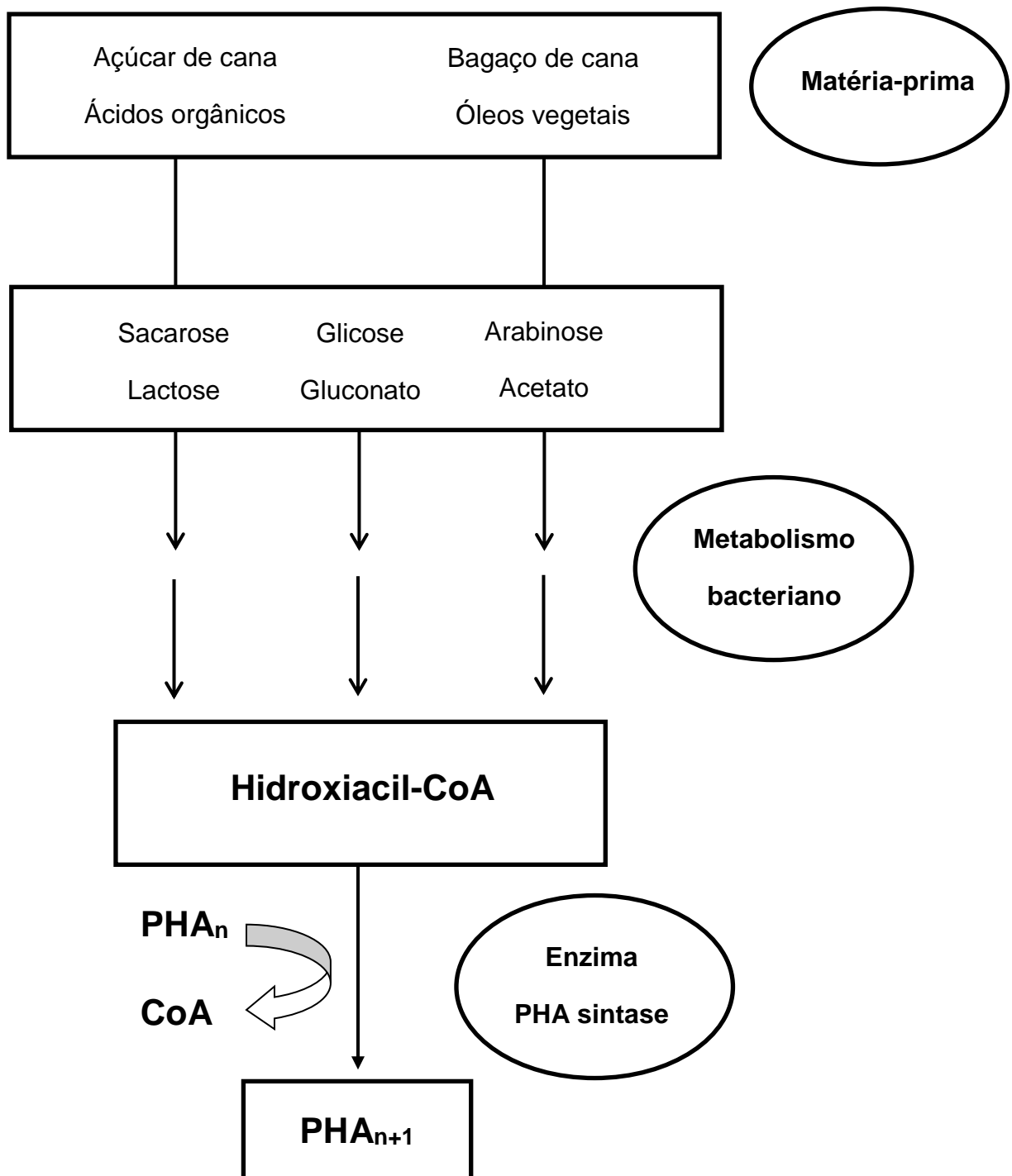


FIGURA 2 – FLUXOGRAMA GERAL DAS PRINCIPAIS ETAPAS ENVOLVIDAS NO METABOLISMO BACTERIANO DA SÍNTESE DOS PHAS
(FONTE: DA SILVA *et al.*, 2007)

Portanto, o conhecimento e o domínio da rota de síntese bacteriana para os PHAs é de fundamental importância na produção de polímeros adequados para as aplicações desejadas. Um exemplo disso é a promoção de modificações, no processo de síntese de PHAs, para produção do PHBV, por exemplo.

No Brasil, tanto o copolímero PHBV como o homopolímero PHB vem sendo produzido pela PHB Industrial S.A. com o nome comercial de Biocycle L-110 e L-99, respectivamente. Ambos são produzidos pela fermentação microbiana da sacarose proveniente da cana-de-açúcar (MACHADO *et al.*, 2010).

As unidades hidroxivalerato incorporadas permitem a melhoria das propriedades anteriormente citadas, com relação às observadas no PHB. Propriedades mecânicas, nas quais contribuem para uma ampla janela de processamento e maior resistência à ruptura. Estruturalmente, o PHBV apresenta unidades repetitivas (meros) constituídos de nove carbonos com a presença de grupos hidroxila e carboxila no final das cadeias poliméricas (FIGURA 3) (MODI *et al.*, 2013).

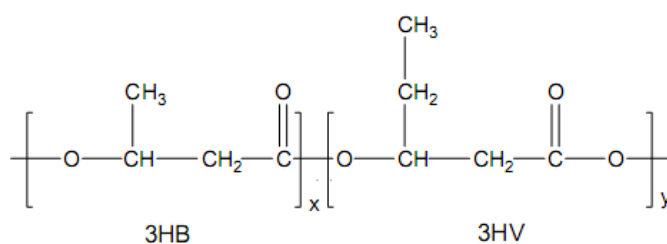


FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO DO MERO DO COPOLÍMERO PHBV

A biodegradabilidade do copolímero é aumentada quando comparada com seu homopolímero, porque o decréscimo na porcentagem de cristalinidade, com o aumento do teor de unidades hidroxivalerato, facilita o acesso das enzimas produzidas pelas cepas bacterianas, junto as ligações éster, facilmente hidrolizáveis (LI *et al.*, 2014; MODI *et al.*, 2013).

Além da degradação enzimática, o PHBV pode ser degradado por meio de mecanismos hidrolíticos (FIGURA 4). No mecanismo de degradação hidrolítica do PHBV, pode ocorrer hidrólise ácida ou básica da ligação éster. Isto ignifica que polímeros biodegradáveis podem ser decompostos na presença de fluidos corporais resultando em produtos de degradação que podem ser metabolizados e eliminados ou reabsorvíveis pelo o organismo (LIU *et al.*, 2009; KE *et al.*, 2009; MAINARDES *et al.*, 2006; SQUIO e ARAGÃO, 2004). Quando no meio ambiente, como por exemplo no solo, o mecanismo de degradação hidrolítica ácida é predominante, visto que a maioria dos solos agriculturáveis no Brasil apresentam pH ligeiramente ácido.

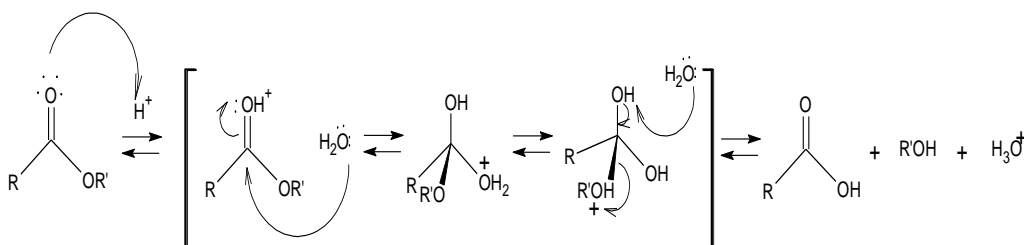


FIGURA 4 – MECANISMO DE DEGRADAÇÃO HIDROLÍTICA (HIDRÓLISE ÁCIDA DA LIGAÇÃO ÉSTER)

O interesse da indústria nos PHAs está crescente, já que são termoplásticos biodegradáveis, bioreabsorvíveis e biocompatíveis com funcionalidade equivalente aos polímeros sintéticos não degradáveis, originários de fonte petroquímica (MODI *et al.*, 2013; PENG *et al.*, 2011).

Dentre os usos mais relatados na literatura estão a fabricação de materiais para embalagens, utilização em procedimentos cirúrgicos tais como a engenharia de tecidos e os implantes para a área médica, além do preparo de sistemas de liberação controlada de moléculas bioativas (SENHORINI *et al.*, 2012; PENG *et al.*, 2011; KE *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2009; FARAGO *et al.*, 2008; KÖSE *et al.*, 2005; GÜRSEL *et al.*, 2000).

SENHORINI *et al.* (2012) encapsularam óleo de andiroba fazendo uso do PHBV como matriz polimérica. O óleo foi escolhido devido às suas propriedades interessantes como inseticida e medicinal. A técnica de encapsulação utilizada foi emulsão simples seguida de evaporação do solvente. O estudo mostrou boa

perspectiva para a aplicação de outros produtos naturais, previamente testados em laboratório e com eficácia comprovada.

KE *et al.* (2010) fizeram uso de filmes de PHBV como suporte para crescimento de células ósseas mesenquimais de ovelha, como forma de estudar a citocompatibilidade. De acordo com o estudo, os filmes de PHBV serviram como suportes na reconstrução ou regeneração de tecido ósseo danificado.

FARAGO *et al.* (2008) desenvolveram um modelo hidrofílico de micropartículas de PHBV, fazendo uso do fármaco cloridrato de metformina, composto amplamente utilizado no controle de Diabetes do tipo 2. O cloridrato de metformina foi escolhido devido ao grande desconforto que causa aos pacientes diabéticos que fazem uso constante deste medicamento. Diferentes parâmetros das formulações foram avaliados como forma de aumentar o teor do princípio ativo incorporado, fazendo uso da metodologia de emulsão múltipla seguida de evaporação do solvente. A metodologia adotada foi bem sucedida.

KÖSE *et al.* (2005) fizeram uso de matrizes de PHBV como carreadoras de células para a construção de cartilagens. A superfície dos filmes de PHBV foram modificadas usando tratamento com plasma oxigenado. A morfologia e características das matrizes foram avaliadas. A proliferação *in vitro* das células foi observada por meio de avaliações histológicas. E a aplicabilidade *in vivo* destes sistemas foram investigados por métodos macroscópicos e histológicos. Os autores observaram que, tanto *in vitro* como *in vivo*, ocorreu adesão e proliferação suficiente de células, responsáveis pela formação da cartilagem. As células aderidas participaram do processo de formação da nova cartilagem.

GÜRSEL *et al.* (2000) fizeram uso do PHBV como carreador de antibióticos no tratamento de células ósseas implantadas que são atingidas por agentes microbianos durante o procedimento de encapsulação. Os resultados mostraram que, os carreadores produzidos e testados no trabalho, agiram como um implante biodegradável efetivo e que podem ser usados na liberação dos antibióticos.

A principal limitação ao uso do PHBV ainda está relacionada com o custo do processo de produção o que o torna um polímero de custo extremamente elevado.

Como pode ser visto, embora existam muitos trabalhos que utilizam o PHBV como matriz polimérica, em diversas áreas, trabalhos que o utilizam como matriz encapsulante, em associação com produtos naturais no controle de pragas, por outro lado, ainda é incipiente, constituindo-se em um vasto campo a ser explorado.

Estudos como estes são de fundamental importância pois podem permitir o surgimento de novas tecnologias de controle de pragas, mais eficazes do que as que já se encontram no mercado, apresentando características desejáveis como baixa toxicidade para organismos não alvos, seletividade para organismos alvos, biocompatibilidade e biodegradabilidade.

3.2.ALGINATOS E SUAS APLICAÇÕES

De acordo com a literatura, os alginatos são extraídos e isolados de algas marrons encontradas em regiões litorâneas costeiras (LERTSUTTHIWONG *et al.*, 2008). As algas produtoras de alginato são pertencentes às espécies *Laminaria hyperborea* e *Macrocystis pyrifera*, que fazem parte de um ecossistema exuberante conhecido como floresta de *kelp* (MÜLLER *et al.*, 2011).

Como forma de reduzir o impacto ambiental causado pela coleta das algas marrons (destruição de corais), o alginato produzido por micro-organismos, torna-se uma alternativa interessante. A produção do alginato microbiano permite obter um produto de maior qualidade pois as condições de síntese podem ser controladas, por meio do uso de substratos de qualidade superior e de características uniformes (MÜLLER *et al.*, 2011).

O primeiro alginato sintetizado a partir de bactérias foi descoberto em 1964, na cepa mucóide de *Pseudomonas aeruginosa*. Mais tarde foi descoberto que bactérias do gênero *Azotobacter* e *Pseudomonas* produziam este mesmo biopolímero. Sabe-se que os alginatos produzidos por cepas bacterianas são semelhantes aos produzidos e extraídos de algas marrons, inclusive com relação à sua biocompatibilidade, o que permite o seu uso em aplicações tradicionais em alimentos e cosméticos e também na área médica e farmacêutica (MÜLLER *et al.*, 2011).

Os alginatos são polissacarídeos aniônicos lineares, constituídos por blocos de ácido β -D-manurônico(M) e α -L-gulurônico(G) ligados entre si por ligações glicosídicas do tipo 1,4 (FIGURA 5) (CHUAH *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2006). Estes polímeros variam de acordo com suas proporções de resíduos manurônicos (M) e

gulurônicos (G) como também com relação à sua sequência na estrutura polimérica (MÜLLER *et al.*, 2011). Suas unidades de M e G podem ser ligadas como blocos homopoliméricos de β -D-manurômico, como blocos de α -L-gulurônico ou como blocos heteropoliméricos de resíduos de M e G alternados (CHUAH *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2006).

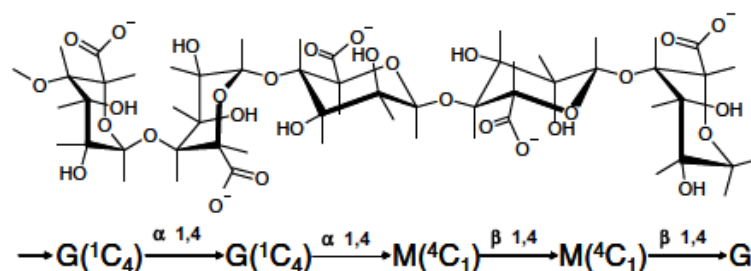


FIGURA 5 - ESTRUTURA MOLECULAR DO POLISSACARÍDEO ANIÔNICO LINEAR, CONHECIDO COMO ALGINATO
(FONTE: LERTSUTTHIWONG *et al.*, 2008)

Os alginatos, em especial o alginato de sódio, é um outro polímero biodegradável, biocompatível e que possui propriedades adesivas (CHUAH *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2006). Assim como o PHBV, vem sendo recentemente utilizado na confecção de sistemas de liberação controlada de moléculas bioativas e na engenharia de tecidos, como relatado na literatura (ALIPOUR *et al.*, 2010; HUNT *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2009; LERTSUTTHIWONG *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2006).

ALIPOUR *et al.* (2010) como forma de minimizar efeitos sistêmicos causados por agentes quimioterapêuticos, resolveram desenvolver um sistema de liberação controlada destes agentes com a finalidade de reduzir a toxicidade e aumentar a eficácia dos fármacos nos sítios específicos. O uso do alginato de sódio para esta finalidade foi de fundamental importância devido às características de biodegradabilidade, biocompatibilidade e muco-adesiva do polímero. Os resultados mostraram que as micropartículas carregadas com o agente quimioterapêutico inibiu o crescimento de células cancerígenas com a mesma eficácia que o agente em seu estado puro.

SILVA *et al.* (2006) preparou micropartículas de alginato contendo insulina como forma de aumentar a proteção do mesmo em pH gástrico simulado e obter a liberação controlada em pH intestinal simulado. As micropartículas formuladas foram

recobertas com quitosana com a finalidade de se alcançar este objetivo. Os resultados mostraram que a liberação da insulina em pH gástrico foi prevenido pelo recobrimento com quitosana enquanto que em pH intestinal, a liberação foi imediata, portanto, não foi promovida liberação sustentada da insulina.

As características do alginato também o tornam um material atrativo para a construção de órgãos biohíbridos e micro-biorreatores pois sua rede tridimensional hidratada permite que as células usadas sejam aderidas, e que se proliferem rapidamente, interagindo umas com as outras (WANG *et al.*, 2009).

Apesar de suas propriedades interessantes, os alginatos apresentam certas limitações de aplicação quanto às suas propriedades mecânicas e de barreira à permeação gasosa, e fraca resistência à água (ABDOLLAHI *et al.*, 2013).

Assim como para o PHBV, existem muitos trabalhos que utilizam o alginato como matriz, em diversas áreas. Embora, os trabalhos que o utilizam como agente encapsulante em associação a produtos naturais, sejam recentes, existe ainda um vasto campo a ser explorado.

Ainda sobre os alginatos, sabe-se que esses biopolímeros, na presença de cátions divalentes como o Ca^{2+} , Sr^{2+} e Ba^{2+} , possuem tendência à geleificação, formando um hidrogel, no qual os íons sódio (Na^+) são substituídos por cálcio, formando, desta forma, uma rede tridimensional de cálcio semelhante a um modelo de “caixa de ovos” (FIGURA 6) (SHI *et al.*, 2011; CHUAH *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2006).

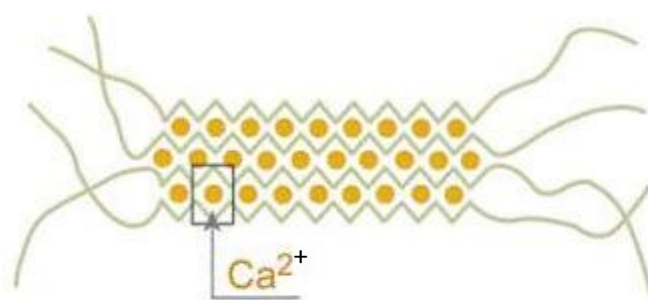


FIGURA 6 - ESQUEMA DE UM MODELO DE “CAIXA DE OVOS” FORMADA PELA SUBSTITUIÇÃO DOS CÁTIONS SÓDIO (Na^+) POR CÁTIONS DIVALENTES (Ca^{2+} , Sr^{2+} e Ba^{2+}) (FONTE: CARGILL)

A sua capacidade em formar géis é dependente de características como a proporção de unidades manurônicas (M) e gulurônicas (G) e quantidade de ligações cruzadas formadas ao longo das cadeias. Portanto, o biopolímero para geleificar, deve apresentar número e extensão significativos de resíduos gulurônicos. É válido lembrar que os alginatos produzidos tanto por algas como por bactérias, apresentam, em suas estruturas, blocos de ácido manurônico (M) e de ácido gulurônico (G). Embora alguns alginatos produzidos possam apresentar unidades manurônicas acetiladas (FIGURA 7), alternadas com blocos de ácido manurônico e gulurônico (MÜLLER *et al.*, 2011).

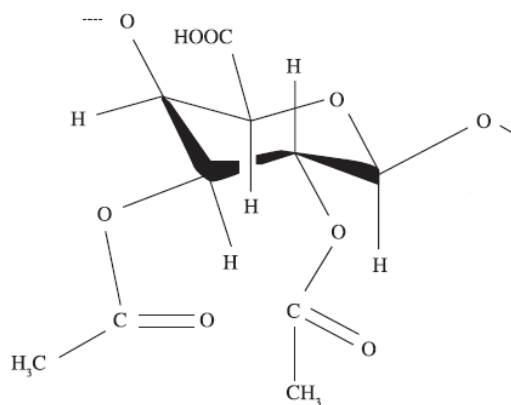


FIGURA 7 - FÓRMULA ESTRUTURAL DE UMA UNIDADE DE ÁCIDO MANURÔNICO ACETILADO, SINTETIZADO POR MICRO-ORGANISMOS (FONTE: MÜLLER *et al.*, 2011)

3.3.SISTEMAS DE LIBERAÇÃO MODIFICADA DE MOLÉCULAS BIOATIVAS

Como já foi relatado anteriormente para os biopolímeros PHBV e alginato, a busca por sistemas de liberação modificada de moléculas bioativas tem sido intensa nos últimos anos. E os polímeros biodegradáveis e biocompatíveis tem recebido grande atenção.

O desenvolvimento destes sistemas se iniciou com o objetivo de promover liberação sustentada, vetorizada ou controlada de moléculas bioativas. Por meio da

liberação modificada é possível reduzir efeitos adversos como a toxicidade a certos medicamentos, aumentar a eficácia de tratamentos terapêuticos, reduzir a perda de material encapsulado para o meio ambiente por meio de um processo de volatilização, entre outros benefícios (AZEREDO, 2005).

A busca por estes sistemas de liberação de moléculas bioativas é uma consequência do desenvolvimento de formulações, para serem utilizadas nas indústrias agrícola, alimentícia, farmacêutica ou cosmética.

O processo responsável pela produção de micro/nanopartículas é conhecido como micro/nanoencapsulação. A encapsulação consiste em empacotar, por meio de uma matriz polimérica, pequenas partículas da molécula bioativa (GHARSALLAOUI *et al.*, 2007; AZEREDO, 2005). Segundo a literatura, a molécula bioativa é denominada material de núcleo (*core*) enquanto que a matriz polimérica é conhecida por material encapsulante, cobertura ou camada (*shell*). Portanto, as micro/nanopartículas formadas são constituídas de uma estrutura bastante conhecida, chamada de *core-shell* (AZEREDO, 2005; SILVA *et al.*, 2003).

As micro/nanopartículas formadas, por meio dos diversos processos de encapsulação existentes, podem ser classificadas em dois tipos: micro/nanocápsulas ou micro/nanoesferas (FIGURA 8). Nas micro/nanocápsulas, o núcleo apresenta ao seu redor, um invólucro de material encapsulante, utilizado na encapsulação. Por outro lado, nas micro/nanoesferas o material de núcleo encontra-se disperso, no qual uma fração pequena do material encapsulado permanece exposto na superfície, seja por retenção ou por adsorção à matriz (AZEREDO, 2005; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2003).

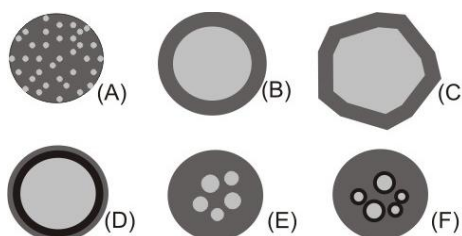


FIGURA 8 – TIPOS DE MICRO/NANOPARTÍCULAS FORMADAS POR MÉTODOS DE ENCAPSULAÇÃO DIVERSOS: MICRO/NANOCÁPSULAS E MICRO/NANOESFERAS. (A): MODELO DE MICRO/NANOESFERA; (B, C, D, E E F): MODELOS DE MICRO/NANOCÁPSULAS. (B): MICRO/NANOCÁPSULA SIMPLES COM ÚNICO NÚCLEO ENVOLTO POR MATERIAL ENCAPSULANTE; (C): MICRO/NANOCÁPSULA SIMPLES IRREGULAR COM ÚNICO NÚCLEO ENVOLTO POR UMA CAMADA DE MATERIAL ENCAPSULANTE; (D): MICRO/NANOCÁPSULA CONSTITUÍDA POR DUAS CAMADAS DE MATERIAL

ENCAPSULANTE; (E): MICRO/NANOCÁPSULA FORMADA POR VÁRIOS NÚCLEOS E (F): DIVERSAS MICRO/NANOCÁPSULAS AGRUPADAS
(FONTE: AZEREDO, 2005)

Micropartículas são definidas como pequenas partículas sólidas, com tamanhos que variam entre 0,1 e 1000 μm . Segundo a ASTM International E 2456-06 (2012), as nanopartículas, por sua vez, apresentam diâmetros que variam entre 1 e 100 nm. Mas segundo a British Standards Institution (BSI), o surgimento de propriedades diferentes ao material *bulk* ou estendido fazem parte da definição de nanopartículas. Portanto, segundo a BSI, estas partículas podem possuir tamanho superior a 100 nm se o material apresentar propriedades físicas, químicas ou mecânicas diferentes do sólido *bulk*.

Existem vários métodos de encapsulação relatados na literatura (FRITZEN-FREIRE *et al.*, 2012; SENHORINI *et al.*, 2012; SOLOMON *et al.*, 2012; CHÁVARRI *et al.*, 2010; HEIDEBACH *et al.*, 2010), dos quais destacam-se: atomização (*spray-drying*), coacervação, emulsificação/evaporação de solvente, geleificação iônica, entre outros.

A técnica de *spray-drying* (FIGURA 9A) é bastante usada na indústria alimentícia na encapsulação de sabores e aromas pois é barata, de fácil e contínua operação e produz partículas de boa qualidade. Este método de encapsulação consiste em preparar uma mistura do material do núcleo e do encapsulante, inseri-la em um spray dryer e atomizá-la em um bocal. O solvente (água) é evaporado em contato com a corrente de ar quente e, desta forma, é atomizado. As partículas produzidas são coletadas e secas. Em geral, uma limitação da técnica é o material encapsulante, que deve ser solúvel em meio aquoso.

O método de coacervação consiste na separação de fases de um ou mais hidrocolóides (chamada matriz encapsulante) que estão, inicialmente, em uma mesma solução e a subsequente deposição do coacervato (aglomerado dos hidrocolóides) formado, ao redor da molécula bioativa suspendida ou emulsificada na mesma solução na qual encontra-se a matriz encapsulante. Apesar de ser um método de encapsulação bastante eficiente, apresenta como limitação o custo elevado.

A emulsificação seguida de evaporação do solvente, um dos métodos utilizados neste trabalho, envolve três etapas (FIGURA 9C): a primeira consiste em

misturar a molécula bioativa em uma solução polimérica, na segunda, a solução resultante é vertida sobre uma solução aquosa de surfactante sob agitação constante, para formação da emulsão e por último, o solvente orgânico é evaporado ainda sob agitação constante. É um método simples mas é limitado para algumas aplicações devido ao uso de solventes clorados.

A geleificação iônica (FIGURA 9B), uma outra técnica usada neste trabalho, é baseada no gotejamento de uma solução aquosa de um hidrocolóide em uma solução aquosa de um sal, geralmente o cloreto de cálcio (CaCl_2), o que promove a formação de ligações cruzadas entre o íon Ca^{2+} e as cadeias do hidrocolóide em questão. Desta forma, ocorre a formação de um gel, que simplesmente é uma rede tridimensional hidratada.

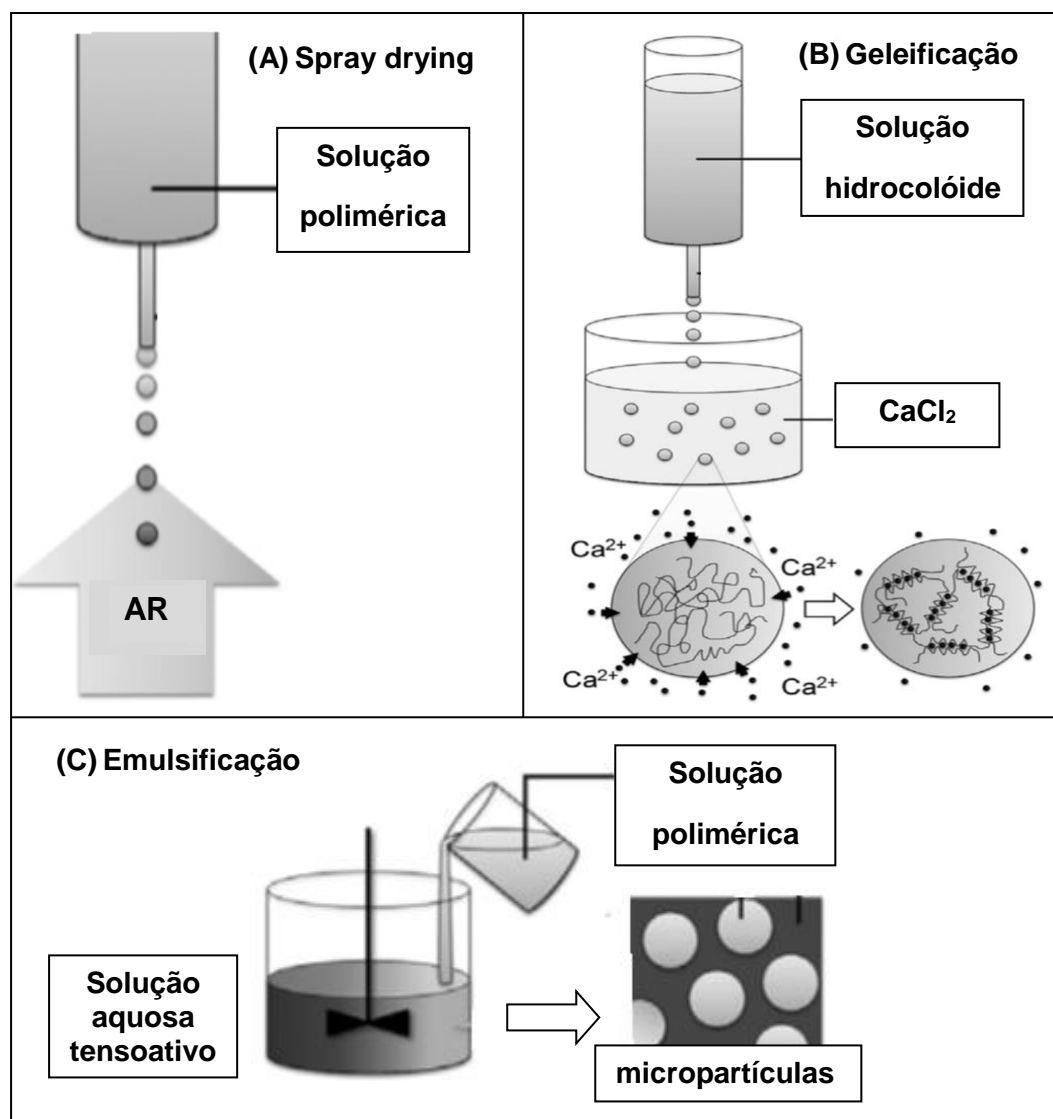


FIGURA 9 – ALGUNS MÉTODOS DE ENCAPSULAÇÃO UTILIZADOS, RELATADOS NA LITERATURA: (A) MÉTODO DE ATOMIZAÇÃO (SPRAY DRYING), (B) MÉTODO DE GELEIFICAÇÃO IÔNICA E (C) MÉTODO DE EMULSIFICAÇÃO SEGUIDA DE EVAPORAÇÃO DO SOLVENTE ORGÂNICO
(FONTE: VEMMER E PATEL, 2013)

Logo, a escolha do melhor método de encapsulação vai depender do que se deseja obter, ou seja, do tamanho de partículas requerido, da aplicação do produto final, dos mecanismos desejados de liberação, da escala de produção, do custo, entre outros. Além disso, é necessário levar em consideração as propriedades físico-químicas do material encapsulante e do material de núcleo (AZEREDO, 2005).

Para os fármacos e constituintes alimentícios já existem muitos estudos publicados (BETZ e KULOZIK, 2011; BETANCUR-ANCONA *et al.*, 2011; JUN-XIA *et al.*, 2011; LAOHASONGKRAM *et al.*, 2011; QUISPE-CONDORI *et al.*, 2011; NG *et al.*, 2010). Por outro lado, a aplicação de processos de encapsulação, em associação aos polímeros biodegradáveis e biocompatíveis e produtos naturais voláteis, para controle de pragas, é um campo a ser explorado mais efetivamente, pois ainda é recente (SOLOMON *et al.*, 2012).

SOLOMON *et al.* (2012) encapsularam óleo de citronela, extremamente volátil, como forma de reduzir as taxas de volatilização e utilizá-lo, desta forma, como repelente para mosquitos. Isto porque as preparações tópicas tem seu uso limitado devido à rápida volatilidade deste óleo.

Como forma de desenvolver tecnologia alternativa para o controle da praga *D. speciosa*, utilizando os polímeros PHBV e alginato de sódio, o *p*-DMB, um semioquímico volátil, foi um dos escolhidos devido ao seu poder de atração, frente ao inseto-praga estudado.

3.4. SEMIOQUÍMICO: *p*-DMB

Uma das maneiras utilizadas no controle de pragas agrícolas e florestais envolve a utilização de semioquímicos. Os semioquímicos (sinais químicos) (FIGURA 10) são substâncias liberadas por seres vivos e detectadas por outros da mesma espécie (comunicação intra-específica) denominados de feromônios ou por outras espécies (comunicação inter-específica) chamados de aleloquímicos,

produzindo, desta forma, alterações comportamentais significativas nos indivíduos envolvidos. Sabe-se que estes compostos apresentam inúmeras possibilidades de aplicação, dentre elas, seu uso no controle de artrópodes fitófagos (ZARBIN *et al.*, 2009; FERREIRA *et al.*, 2001).

O *p*-DMB foi identificado por Ventura e colaboradores (2007) como um cairomônio (aleloquímico) para a *D. speciosa* (ANVISA, 2013). Cairomônio é um tipo de semioquímico emitido por indivíduos de uma certa espécie e que causa, em indivíduos de uma outra espécie, um comportamento de atração. A vantagem nessa comunicação, é a do receptor que consegue, por exemplo, localizar a fonte emissora, que servirá como fonte de alimento (FIGURA 11) (ZARBIN *et al.*, 2009; FERREIRA *et al.*, 2001).

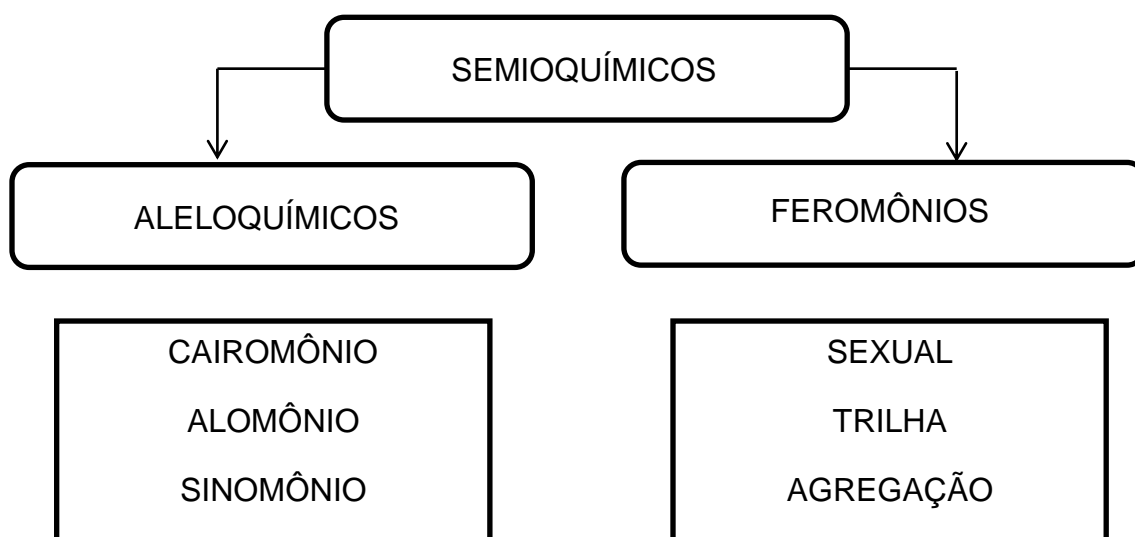


FIGURA 10 – CLASSIFICAÇÃO ADOTADA PARA SEMIOQUÍMICOS, SUAS SUBDIVISÕES E CRITÉRIOS BIOLÓGICOS CONSIDERADOS PARA A CLASSIFICAÇÃO DESTES COMPOSTOS
(FONTE: ZARBIN *ET AL.*, 2009)

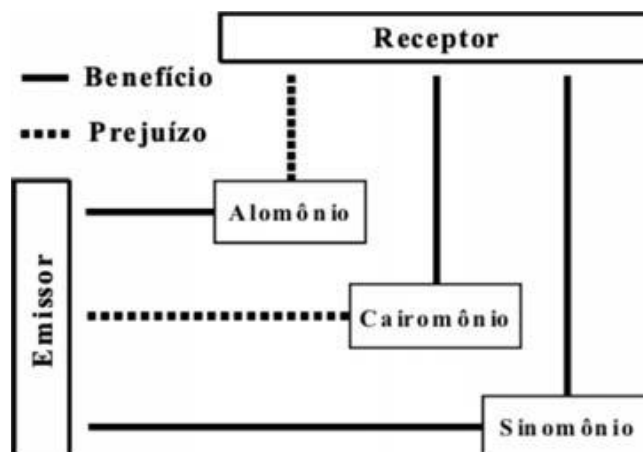


FIGURA 11 – CLASSIFICAÇÃO ADOTADA PARA OS ALELOQUÍMICOS COM BASE EM CRITÉRIOS BIOLÓGICOS COMO ESPÉCIE BENEFICIADA OU PREJUDICADA, DE ACORDO COM A RESPOSTA AO SEMIOQUÍMICO ESTUDADO (FONTE: ZARBIN *ET AL.*, 2009)

O *p*-DMB (FIGURA 12) é um éter aromático natural de odor doce, volátil, que se apresenta, comercialmente, na forma de cristais brancos, ligeiramente solúveis em água. É usado na atividade agrícola como atraente floral para a *Diabrotica speciosa* (ANVISA).

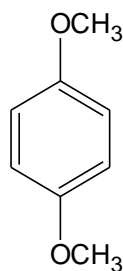


FIGURA 12 – ESTRUTURA QUÍMICA DO ATRAENTE FLORAL *P*-DMB UTILIZADO NO CONTROLE DE *D. speciosa*, IMPORTANTE PRAGA AGRÍCOLA (FONTE: ANVISA)

Comercialmente, o *p*-DMB é obtido por meio da síntese de Williamson, na qual fenóis podem ser convertidos a éteres. Os fenóis por serem mais ácidos que os álcoois, são convertidos em fenóxido de sódio por meio do uso de hidróxido de sódio (NaOH) (FIGURA 13).

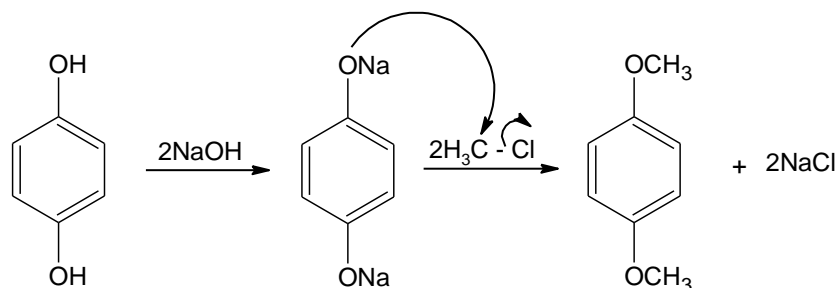


FIGURA 13 – ESQUEMA DA SÍNTESE DE WILLIAMSON PARA PRODUÇÃO DO ATRAENTE FLORAL *p*-DMB
(FONTE: SOLOMONS E FRYHLE, 2006)

Naturalmente, pode ser obtido a partir de plantas do gênero *Salix*, pertencente à família Salicaceae. Plantas de diversos portes, desde vegetação rastejante até árvores de grande porte, fazem parte desta família. O *p*-DMB também pode ser extraído de plantas pertencentes à família Cucurbitaceae mais especificamente da espécie *Cucurbita pepo* (FIGURA 14). É sabido que este semioquímico tem sido produzido pelas plantas desta espécie, para se defender, contra o desenvolvimento de doenças causadas por fungos. Compostos que apresentam propriedade de defesa são conhecidos como fitoalexinas (*phytos* = planta e *alekein* = defender), ou seja, substâncias de baixa massa molar que possuem propriedades anti-microbianas.



FIGURA 14 – FOTO DE PLANTA RASTEIRA PERTENCENTE À FAMÍLIA CUCURBITACEAE DA ESPÉCIE *CUCURBITA PEPO* (ABÓBORA)

Como forma de mostrar a eficácia do *p*-DMB frente à *D. speciosa*, Marques e colaboradores (2009) prepararam armadilhas contendo o *p*-dimetoxibenzeno e seus análogos sintéticos e comerciais. As armadilhas foram instaladas em plantações de feijão e, decorridas 24 horas, os resultados foram avaliados. Foi possível observar que as armadilhas contendo o *p*-DMB capturou mais insetos que as demais armadilhas, mostrando, desta forma, a capacidade de atração do cairomônio frente à espécie estudada.

Portanto, o uso do *p*-DMB em sua forma encapsulada, como um sistema de liberação modificada, em associação com extratos contendo um outro produto natural; as cucurbitacinas, são de extrema importância para a redução da frequência de aplicação dos produtos desenvolvidos, além de permitir criar uma tecnologia alternativa eficaz no controle de *D. speciosa*.

3.5. AS CUCURBITACINAS

As cucurbitacinas são triterpenóides tetracíclicos oxigenados, encontrados predominantemente em plantas da família Cucurbitaceae (HABIB *et al.*, 2014; MA *et al.*, 2014). São constituídas por um esqueleto cucurbitano (FIGURA 15), presente em algumas plantas na forma de β -glicosídeos (MA *et al.*, 2014). Para os vertebrados, são compostos altamente tóxicos e de sabor desagradável, enquanto que, para *Diabrotica speciosa* têm manifestado ação fagoestimulante (VENTURA *et al.*, 2005; SANCHES e ISHIMURA, 2001; ANDERSEN *et al.*, 1988). Apesar de serem compostos tóxicos, para a espécie *D. speciosa* efeito contrário é observado. Estes insetos alimentam-se destes compostos com frequência usando-os como defesa contra eventuais predadores (ANDERSEN *et al.*, 1988). Os adultos da espécie as identificam em pequenas quantidades (nanogramas) por meio de receptores sensoriais localizados no palpo maxilar (ARRUDA-GATTI e VENTURA, 2003).

Estes produtos naturais, de origem vegetal, tem sido encontrado em todas as partes das plantas, desde suas raízes até suas sementes, nas quais estão em menor concentração (ARRUDA-GATTI e VENTURA, 2003). Geralmente, são

extraídas dos frutos da espécie *Lagenaria vulgaris*, conhecido como cabaça ou porongo (VENTURA *et al.*, 2005). As cucurbitacinas tem se revelado como potenciais ferramentas no controle de *D. speciosa* (MIKAMI e VENTURA, 2008; VENTURA *et al.*, 2005; ARRUDA-GATTI e VENTURA, 2003).

MIKAMI e VENTURA (2008) avaliaram a eficácia da isca amilácea de cucurbitacina (espécie *Lagenaria vulgaris*) associada ao inseticida sintético carbaril frente à *D. speciosa*, estudo este realizado em laboratório. Plantas de milho foram pulverizadas com carbaril, água destilada (grupo controle), isca amilácea de cucurbitacina isolada e inseticida e isca, associados. Para estudo da eficácia foram avaliados o consumo foliar e a mortalidade dos insetos. Como resultado, foi observado que a isca de cucurbitacina exerceu efeito fagoestimulante aos adultos de *D. speciosa* e a adição da isca ao inseticida carbaril aumentou a eficiência do pesticida.

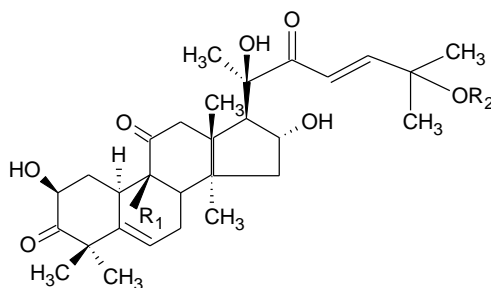
VENTURA *et al.* (2005) conduziram estudos em lavoura de feijoeiro, como forma de avaliar as respostas da *D. speciosa* frente aos diferentes tipos e composições de armadilhas. Armadilhas de copos plásticos amarelo ouro capturaram mais insetos do que as armadilhas confeccionadas com copos plásticos transparentes. Placas de Petri com cenoura e pó de porongo (fonte de cucurbitacina) capturaram mais insetos do que somente placas contendo cenoura. Assim como armadilhas contendo o atraente floral *p*-DMB, capturaram mais insetos do que as armadilhas sem o composto volátil.

As cucurbitacinas tem despertado bastante interesse, não somente pelo seu potencial uso no controle de pragas, mas devido à sua toxicidade e espectro abrangente de atividades biológicas. Dentre as mais variadas aplicações, podem ser destacados seu uso como anti-inflamatório, sua função hepato-protetora, analgésica, anti-pirética e suas propriedades anti-oxidantes (HABIB *et al.*, 2014; MA *et al.*, 2014).

Dentro da família Cucurbitaceae há, aproximadamente, 100 gêneros de plantas como *Cucurbita*, *Lagenaria*, *Marah*, *Cucumis*, entre outras que biossintetizam as cucurbitacinas (MIKAMI e VENTURA, 2008; MACEDO *et al.*, 2007).

Essas substâncias são produtos provenientes do metabolismo secundário das plantas da família Cucurbitaceae, mas podem vir a ser encontradas, em menor frequência, em outras famílias como Begoniaceae, Datisceae, Euphorbiaceae, entre outras. Mais de 20 tipos de cucurbitacinas já foram identificadas (FIGURA 15), embora as do tipo B e E sejam as mais abundantes, estando presentes em mais de

90% das plantas (VALENTE, 2004; SANCHES e ISHIMURA, 2001). Já as demais cucurbitacinas são formadas a partir do metabolismo das B e E (MACEDO *et al.*, 2007). De acordo com a literatura, cucurbitacinas B e D são as mais fagoestimulantes para a praga *D. speciosa* (SANCHES e ISHIMURA, 2001).



Cucurbitacina A: $R_1 = OH$, $R_2 = Ac$

Cucurbitacina B: $R_1 = H$, $R_2 = Ac$

Cucurbitacina D: $R_1 = R_2 = H$

FIGURA 15 – FÓRMULA ESTRUTURAL DAS CUCURBITACINAS A, B E D
(FONTE: VALENTE, 2004)

De acordo com a literatura, o uso das cucurbitacinas ainda é limitado devido à dificuldade em cultivar plantas que as produzam em quantidades suficientes, sendo necessária, condições adequadas para seu desenvolvimento (VENTURA *et al.*, 1996).

Atualmente, a tecnologia mais utilizada no controle da *D. speciosa* é o uso de inseticida sintético do tipo carbamato, nocivo ao meio ambiente (ARRUDA-GATTI e VENTURA, 2003). Uma metodologia alternativa eficaz e menos nociva ao meio ambiente, para o controle desta praga, seria a utilização de um extrato de origem vegetal, rico em cucurbitacinas e de um atraente floral volátil, como o *p*-DMB, acoplado ao uso de inseticida sintético (VENTURA *et al.*, 2007). Para que a eficácia no controle desta praga seja alcançada, o objetivo é promover a associação do extrato vegetal contendo cucurbitacinas com o atraente floral encapsulado.

3.6. *DIABROTICA SPECIOSA*

A espécie *D. speciosa* (Germar, 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae), praga agrícola, que acomete diversas culturas como a soja, o milho, o feijão e a batata, é conhecida popularmente como vaquinha, brasileirinho, patriota ou larva alfinete (WALSH, 2004; ROBERTO *et al.*, 2001; SALLES, 2000). Suas larvas apresentam coloração branco-leitosa que, quando desenvolvidas por completo, chegam a medir 1cm (FIGURA 16). Já o inseto adulto, é um besouro de cor verde com manchas amarelas, que chega a medir 6mm (FIGURA 17) (EMBRAPA, 2014).



FIGURA 16 – FOTO DA LARVA BRANCO-LEITOSA DE *DIABROTICA SPECIOSA* (VAQUINHA)
(FONTE: IVAN CRUZ – EMBRAPA MILHO E SORGO)



FIGURA 17 – FOTO DA ESPÉCIE *DIABROTICA SPECIOSA* (VAQUINHA)
(FONTE: IVAN CRUZ – EMBRAPA MILHO E SORGO)

No Brasil, país onde esta espécie é predominante, concentra-se em plantações de soja no norte do Paraná e em plantações de milho nas cidades de Arapoti, Ponta Grossa e Castro (MÜLLER, 2003). Esta praga, além de ser encontrada em plantações do Brasil, também ocupa algumas culturas em países da América (ARRUDA-GATTI *et al.*, 2006; ÁVILA e PARRA, 2002).

De acordo com o Ministério do Desenvolvimento Agrário, a *D. speciosa* acomete outras culturas além da soja e do milho. Por ser uma praga polífaga, ataca plantas de várias famílias como algodão, tomate, alface, fumo, cevada, entre outras (PRATISSOLI *et al.*, 2013).

Possui como hábito principal de ocupar, em seu estágio larval, o solo e alimentar-se de raízes e tubérculos, enquanto que, na fase adulta, alimenta-se de folhas, frutos e flores das diversas culturas que habitam. O ciclo de desenvolvimento deste inseto demora em média dois meses para se completar, no qual cada fêmea é capaz de colocar aproximadamente, 2000 ovos. A postura desses ovos são feitas junto à base das plantas hospedeiras (STÜPP *et al.*, 2006).

Sabe-se que a *D. speciosa* é responsável por causar danos irreversíveis nas plantações que acomete, quando não detectada precocemente. A infestação das raízes faz com que ocorra redução na capacidade da planta em absorver água e nutrientes, o que a torna menos produtiva e suscetível ao surgimento de doenças radiculares. Portanto, os danos variam desde queda das folhas até apodrecimento das partes vegetativas da planta, ocorrendo, desta forma, morte repentina dos vegetais (MARQUES *et al.*, 1999).

De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), das áreas brasileiras agriculturáveis (correspondente à 53 milhões de hectares), a cultura de soja ocupa 52,2% das áreas (27,65 milhões de hectares), seguida do milho com 29,1% (15,41 milhões de hectares) e do feijão com 6,0% (3,19 milhões de hectares). O arroz ocupa 4,6% (2,42 milhões de hectares) e o trigo, 3,6% (1,90 milhão de hectares) (FIGURA 18).

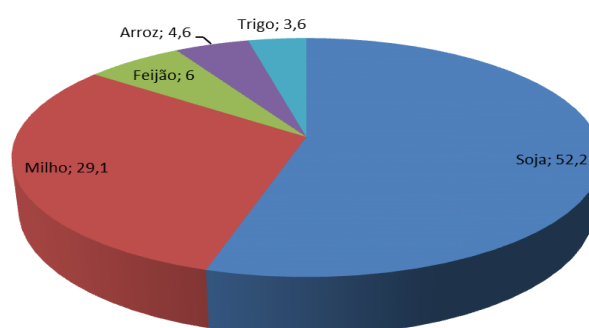


FIGURA 18: ÁREAS AGRICULTURÁVEIS BRASILEIRAS (53 MILHÕES DE HECTARES CORRESPONDENTE À 100%): CULTURA DE SOJA OCUPA 52,2% DAS ÁREAS AGRICULTURÁVEIS, CULTURA DE MILHO OCUPA 29,1%, FEIJÃO OCUPA 6%, ARROZ OCUPA 4,6% E POR FIM, A CULTURA DE TRIGO QUE OCUPA 3,6% DA ÁREA TOTAL AGRICULTURÁVEL (FONTE: CONAB, 2013)

Por isso a necessidade de desenvolver uma tecnologia alternativa eficaz para o controle da praga *D. speciosa*, devido à importância das culturas agrícolas supracitadas para a economia brasileira.

Como não existe, atualmente, no mercado, uma tecnologia específica e alternativa para o controle de populações de *D. speciosa* que não cause agressão ao meio ambiente, para combater o problema, tem-se concentrado na aplicação de inseticidas sintéticos (controle químico), que podem ser altamente tóxicos, como os carbamatos, assim como buscar desenvolver estudos acerca de parasitóides e patógenos que acometem essa praga (ARRUDA-GATTI *et al.*, 2006; ARRUDA *et al.*, 2005; HEINECK-LEONEL e SALLES, 1997).

Portanto, o uso do atraente floral *p*-dimetoxibenzeno, na forma encapsulada, em uma matriz biodegradável, em associação aos extratos de cucurbitacinas fagoestimulantes e inseticida de baixa toxicidade, desenvolvido pelo grupo de pesquisa atualmente, apresentam boa perspectiva no desenvolvimento de uma tecnologia alternativa, eficaz e que cause menor agressão ao meio ambiente no controle da espécie *D. speciosa*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. REAGENTES E SOLVENTES

Os reagentes utilizados, neste trabalho, foram alginato de sódio (ALGOGEL 5540) (CARGILL, Brasil), cloreto de cálcio dihidratado P.A. ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (VETEC), citrato de sódio dihidratado (VETEC), dihidrocucurbitacina B (99% de pureza) adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), *p*-dimetoxibenzeno (*p*-DMB) (99 % de pureza, Sigma-Aldrich. Utilizou-se também o metilparabeno (Nipagin M) (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil), o poli(álcool vinílico) (PVA) (M_n 130.000 $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$, 86,5-89,5 % de hidrólise, VETEC), poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV) (Biocycle® L110, PHB INDUSTRIAL, fornecido pela Grendene, 8% de unidades valerato), o propilparabeno

(Nipasol P) (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil), o Span 60 (HENRIFARMA produtos químicos e farmacêuticos Ltda, São Paulo, Brasil) e Tween 80 P.S. (Polissorbato 80) (65-80 número de hidroxilas, BIOTEC Reagentes Analíticos). O pó de porongo (obtido de frutos verdes provenientes da espécie *Lagenaria vulgaris* L.) foi cedido gentilmente pelo professor Maurício Ursi Ventura (Departamento de Agronomia – Universidade Estadual de Londrina). O brometo de potássio (KBr) foi de grau espectroscópico (ALDRICH). Os solventes usados foram água purificada, água ultrapura obtida pelo sistema PureLab Classic system (ELGA), clorofórmio (CHCl₃) P.A. estabilizado com amileno (VETEC), álcool metílico grau cromatográfico (J.T.BAKER) e etanol P.A. (95 % de teor, IMPEX) utilizado na preparação dos extratos contendo cucurbitacinas. Todos os materiais foram usados como recebido, sem qualquer tratamento prévio.

4.2.EQUIPAMENTOS

Agitador mecânico (FISATOM equipamentos científicos, modelo 713), balança analítica de prato único, balança termogravimétrica (NETZSCH Instruments, modelo TG 209 F1 Iris®), centrífuga para tubos (JOUAN industries, modelo BR 4i), cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector UV-Vis (WATERS), coluna C₁₈ com fase reversa (KINETEX HILIC 100A) com 2,6µm de tamanho de partícula e 50 x 4,6 mm de comprimento por diâmetro interno, difratômetro de raio-X (SHIMADZU Co., modelo XRD-6000), cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector UV-Vis (AGILENT TECHNOLOGIES 1200 SERIES), coluna C₁₈ com fase reversa (ECLIPSE XDB) com 5µm de tamanho de partícula e 150 x 4,6mm de comprimento por diâmetro interno, espectrofotômetro de feixe duplo ultravioleta e visível (UV-Vis) (SHIMADZU), espectrofotômetro na região do infravermelho com transformada de Fourier (BIO-RAD Laboratories, modelo Excalibur series FTS 3500GX), extrator de Soxhlet, microscópio eletrônico de varredura, microscópio ótico Olympus, placa de agitação e aquecimento (CORNING, modelo PC-320), sistema de calorimetria exploratória diferencial (NETZSCH Instruments, modelo Netzsch DSC 203 F1), sistema de medição da dispersão granulométrica (Granulômetro a laser CILAS 1064, do Laboratório de Análises Minerais e Rochas (LAMIR - UFPR).

4.3. MÉTODOS

4.3.1. Preparo de micropartículas de PHBV contendo o *p*-DMB, formuladas pelo método de emulsão simples/evaporação do solvente

Uma solução clorofórmica de PHBV 5% (m/V) (correspondendo, em massa, a 0,75g do polímero em 15mL) foi previamente preparada e o *p*-DMB (0,0676g) foi solubilizado nesta solução polimérica. A solução resultante foi vertida sobre uma solução aquosa de PVA a 2% (m/V) (correspondendo, em massa, a 1,5g de PVA em 75mL), sob agitação mecânica de 2.000 rpm por 5 minutos à temperatura ambiente (FARAGO *et al.*, 2008). O PVA foi utilizado no preparo das micropartículas como agente estabilizante (emulsionante).

Com a formação de uma emulsão estável, o solvente orgânico (clorofórmio) foi evaporado totalmente em capela ligada, sob agitação mecânica de 800rpm, por algumas horas. A suspensão de micropartículas formada foi centrifugada em 3.500rpm por 30 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi armazenado em frascos separados, para posterior determinação da porcentagem de *p*-DMB incorporado, e as micropartículas foram lavadas três vezes com água destilada para remoção do resíduo de PVA.

Após cada lavagem, as amostras foram centrifugadas a 3.500rpm durante 10 minutos à temperatura ambiente, com posterior eliminação da água residual. As micropartículas foram secas à temperatura ambiente, para posterior caracterização. De acordo com este procedimento foram preparadas micropartículas contendo 0%, 9%, 19% e 40% de atraente floral com relação à massa de PHBV (0,75g) e todas foram caracterizadas (TABELA 1).

TABELA 1 - FORMULAÇÕES DE MICROPARTÍCULAS PREPARADAS SEGUNDO O MÉTODO DE EMULSÃO SIMPLES/EVAPORAÇÃO DO SOLVENTE ORGÂNICO, SEM (MP0%) E CONTENDO O *p*-DMB (MP9%, MP19%, MP40%)

| Suspensão de micropartículas | PHBV (m/V)/ Clorofórmio (%) [*] | PVA (m/V)/ Água (%) [*] | <i>p</i> -DMB(g) | <i>p</i> -DMB (m/m) ^{**} (%) |
|------------------------------|---|-------------------------------------|------------------|---------------------------------------|
| MP0%(Controle) | 5,0 | 2,0 | 0,0000 | 0 |
| MP9% | 5,0 | 2,0 | 0,0675 | 9 |
| MP19% | 5,0 | 2,0 | 0,1425 | 19 |
| MP40% | 5,0 | 2,0 | 0,3000 | 40 |

NOTA: ^{*}CONCENTRAÇÕES OBTIDAS POR TRABALHOS ANTERIORES DO GRUPO (FARAGO *et al.*, 2008)

^{**} MASSA DE *p*-DMB COM RELAÇÃO À MASSA DO POLÍMERO PHBV (0,75g)

4.3.2.Preparo de misturas físicas (filmes) PHBV/*p*-DMB

As misturas físicas PHBV/*p*-DMB foram constituídas por 5mL de solução clorofórmica de PHBV 5% (m/V) (0,25g de polímero PHBV) e 0,0225g (MF9%), 0,0475g (MF19%) e 0,1g (MF40%) de *p*-DMB (TABELA 2). Esses filmes foram feitos com base nas formulações das micropartículas preparadas anteriormente. O preparo das misturas físicas (filmes) consistiu em adicionar a três béqueres, 5mL de solução clorofórmica de PHBV 5% (m/V) e, a cada béquer, adicionar e misturar, sob agitação magnética branda, quantidades crescentes de *p*-DMB (compreendendo 9%, 19% e 40% m/m). As soluções resultantes foram vazadas em moldes e deixadas ao ar, para evaporação do solvente. As misturas físicas (filmes) foram designadas por MF0%, MF9%, MF19% e MF40% e todas foram caracterizadas.

TABELA 2 - FORMULAÇÕES DE MISTURAS FÍSICAS (FILMES) PREPARADAS COM BASE NAS FORMULAÇÕES DE MICROPARTÍCULAS DE PHBV, SEM (MF0%) E CONTENDO *p*-DMB (MF9%, MF19%, MF40%)

| Misturas físicas | Solução de PHBV ^a (mL) | <i>p</i> -DMB (g) | <i>p</i> -DMB (%) (m/m) ^b |
|------------------|-----------------------------------|-------------------|--------------------------------------|
| MF0% | 5,0 (0,25g) | 0,0000 | 0 |
| MF9% | 5,0 (0,25g) | 0,0225 | 9 |
| MF19% | 5,0 (0,25g) | 0,0475 | 19 |
| MF40% | 5,0 (0,25g) | 0,1000 | 40 |

^a SOLUÇÃO CLOROFÓRMICA DE PHBV 5% (M/V)

^b COM RELAÇÃO À MASSA DE PHBV (0,25g)

4.3.3. Estudo da degradação química das micropartículas sem *p*-DMB

Os experimentos de degradação química *in vitro* foram realizados com a finalidade de prever a degradação das partículas no meio ambiente, quando forem aplicadas no campo para controle da praga *D. speciosa*. Os ensaios foram feitos na cidade de Curitiba à temperatura ambiente, sem controle de temperatura prévio, durante os meses de Junho, Julho e Agosto (inverno). Para os ensaios, 200mg de micropartículas de PHBV foram imersas em tampão fosfato (pH 5,6). Para prevenir qualquer contaminação biológica, o meio tampão foi trocado a cada 10 dias. As amostras foram mantidas na solução tampão durante o tempo de estudo de 50 dias.

Então, a cada 10 dias, as amostras foram centrifugadas, lavadas com água destilada e secas à temperatura ambiente. Este estudo foi realizado em duplicata e a avaliação de perda de massa (análise gravimétrica) foi determinada.

4.3.4. Preparo das milipartículas de alginato de cálcio, sem otimização, contendo o *p*-DMB, formuladas pelo método de emulsão/geleificação externa

Inicialmente, este método não foi otimizado, ou seja, as concentrações dos reagentes e as condições do experimento não foram estudadas, afim de obter uma melhora na eficiência de encapsulação do atraente floral nas partículas. O método foi baseado no preparo de 50 mL de uma solução aquosa de alginato de sódio 2,5% (m/V). A solução permaneceu em repouso por 24 horas antes do uso, para desaparecimento de bolhas. Paralelamente 100 mL de uma solução aquosa de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (10% m/V) foi também preparada .

À 50 mL de uma solução aquosa de alginato foi adicionado 1% (m/V) de Tween 80 e 2,5 mL de óleo de milho sob agitação mecânica a 2.000 rpm durante 5 minutos para formação de uma emulsão O/A.

Em seguida, a emulsão formada foi gotejada, por meio do uso de uma bureta, na solução aquosa de cloreto de cálcio, sob agitação magnética constante, para formação das milipartículas de alginato de cálcio carregadas com óleo de milho comercial. As milipartículas formadas foram mantidas na solução de geleificação durante 30 minutos sob agitação magnética.

As milipartículas foram filtradas e secas tanto à temperatura ambiente como também foram liofilizadas, para posterior caracterização. Segundo este mesmo procedimento foram preparadas milipartículas de alginato contendo 0%, 1,5%, 2,5% e 3,5% (m/V) de atraente floral *p*-DMB em relação ao volume de óleo adicionado em cada formulação (2,5mL) (TABELA 3). O atraente floral foi previamente solubilizado no óleo de milho por uso de ultrassom.

TABELA 3 - FORMULAÇÕES DE MILIPARTÍCULAS DE ALGINATO DE CÁLCIO PREPARADAS SEGUNDO O MÉTODO EMULSÃO/GELIFICAÇÃO EXTERNA, SEM ATRAENTE FLORAL (ALG-CA 0%) E CONTENDO *p*-DMB (ALG-CA 1,5%, ALG-CA 2,5% E ALG-CA 3,5%)

| Formulações preparadas | <i>p</i> -DMB (g) |
|------------------------|-------------------|
| Alg-Ca 0% | 0 |
| Alg-Ca 1,5% | 0,0375 |
| Alg-Ca 2,5% | 0,0625 |
| Alg-Ca 3,5% | 0,0875 |

4.3.5. Determinação do equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) do óleo de milho comercial, previamente ao preparo das milipartículas de alginato de cálcio otimizadas

Com a finalidade de otimizar as concentrações de reagentes para obtenção de uma maior eficiência de encapsulação do *p*-DMB, previamente ao preparo das milipartículas de alginato de cálcio, foi realizada a determinação do equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) do óleo de milho comercial. Esta determinação possui como objetivo (TABELA 4), a descoberta da proporção variável do par de tensoativos Span 60 e Tween 80, utilizados neste processo, o que proporcionará uma maior estabilidade para as emulsões preparadas no processo de desenvolvimento das milipartículas de alginato de cálcio.

O EHL representa um sistema de classificação de tensoativos, que possui como base os parâmetros de solubilidade desses compostos em solventes polares e/ou pouco polares. Sabe-se que quanto maiores os valores de EHL do tensoativo, mais hidrofílica é a molécula. Estes agentes emulsificantes podem ser usados isoladamente, mas o são preferencialmente utilizados aos pares, combinados. O equilíbrio hidrófilo-lipófilo das emulsões foi calculado de acordo com a literatura (ZANIN *et al.*, 2002), em que é realizada uma média ponderada dos valores de EHL individuais dos tensoativos utilizados e suas respectivas concentrações (massa). Emulsões com o óleo de milho foram preparadas mantendo-se constante a quantidade do mesmo adicionada e misturando-se, em proporções variáveis, o par de tensoativos Span 60 e Tween 80 (TABELA 4).

TABELA 4 - PROPORÇÕES DE REAGENTES UTILIZADOS NO PREPARO DAS EMULSÕES DE ÓLEO DE MILHO

| Emulsão | Span 60 (g) | Tween 80 (g) | Óleo (g) | Água (g) |
|---------|-------------|--------------|----------|----------|
| 1 | 0,0 | 1,0 | 2 | 17 |
| 2 | 0,2 | 0,8 | 2 | 17 |
| 3 | 0,4 | 0,6 | 2 | 17 |
| 4 | 0,5 | 0,5 | 2 | 17 |
| 5 | 0,6 | 0,4 | 2 | 17 |
| 6 | 0,8 | 0,2 | 2 | 17 |

O método utilizado no preparo destas emulsões, foi o de misturar ambas as fases (aquosa e oleosa) após aquecer cada uma. Este consiste em adicionar, na fase oleosa, o agente emulsificante e outros compostos solúveis em óleo e adicionar, na fase aquosa, os componentes hidrossolúveis. Em ambas as fases, um conservante foi adicionado: o Nipagin foi sempre usado na concentração 0,2% (m/m) enquanto que o Nipazol foi utilizado na concentração 0,05% (m/m). Portanto, para o preparo de uma emulsão a 10% (m/m) de óleo, por exemplo, foi adicionado, em um béquer, o óleo de milho comercial (2,0g), o tensoativo monoestearato de sorbitano (Span 60) (0,5g) e o Nipazol (0,01g). Em outro béquer, foi adicionado água destilada (17g), o monooleato de sorbitano (Tween 80) (0,5g) e Nipagin (0,04g). As fases aquosa e oleosa foram aquecidas, simultaneamente, a uma temperatura de 75°C, com auxílio de banho-maria para completa solubilização de todos os seus constituintes. Após solubilização dos componentes, a fase aquosa foi vertida sobre a fase oleosa e a mistura foi agitada manualmente com auxílio de bastão de vidro por cerca de 5 minutos ainda sob aquecimento em banho-maria. Após ser removida do banho-maria, a mistura ainda foi agitada manualmente até atingir a temperatura ambiente, com a finalidade de promover a estabilidade (GENNARO, 2004; PRISTA *et al.*, 2003; ZANIN *et al.*, 2001).

4.3.6.Preparo das milipartículas de alginato de cálcio, otimizadas, contendo o *p*-DMB, formuladas pelo método de emulsão/geleificação externa

Uma solução aquosa de alginato de sódio 2,5%(m/V) foi previamente preparada (100 mL). A solução permaneceu em repouso por 24 horas antes do uso, para desaparecimento de bolhas. Paralelamente, 200 mL de uma solução aquosa de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (10% m/V) foi também preparada .

À 89mL de uma solução aquosa de alginato foi adicionado 0,2g de Tween 80 e em 10mL de óleo de milho foi solubilizado a quente 0,8g de Span 60. Sob agitação mecânica a 2000 rpm durante 5 minutos, a fase oleosa foi vertida sobre a fase aquosa, para formação de uma emulsão O/A.

Em seguida, a emulsão formada foi gotejada, por meio do uso de uma bureta, na solução aquosa de cloreto de cálcio, sob agitação magnética constante, para formação das milipartículas de alginato de cálcio carregadas com óleo de milho comercial. As milipartículas formadas foram mantidas na solução de geleificação durante 30 minutos sob agitação magnética.

As milipartículas foram filtradas e secas tanto à temperatura ambiente como também foram liofilizadas, para posterior caracterização. Segundo este mesmo procedimento foram preparadas milipartículas de alginato contendo 0%, 1,5%, 2,5% e 3,5% (m/V) de atraente floral *p*-DMB em relação ao volume de óleo adicionado em cada formulação (2,5 mL) (TABELA 3). O atraente floral foi previamente solubilizado no óleo de milho por uso de ultrassom.

4.3.7.Preparo de misturas físicas alginato de sódio/*p*-DMB

As misturas físicas (filmes) alginato de sódio/*p*-DMB foram preparadas da seguinte forma: 10mL de solução aquosa de alginato de sódio 2,5% (m/V) (0,25g de polímero), 0,5mL de óleo de milho, 1% (m/V) de Tween 80 (com relação ao volume da solução de alginato de sódio) e 0,008g (MF1,5%), 0,013g (MF2,5%) e 0,018g (MF3,5%) de *p*-DMB (TABELA 5). Esses filmes de alginato de sódio/*p*-DMB foram

feitos baseados nas formulações das milipartículas preparadas anteriormente. Para o preparo das misturas físicas (filmes) foi adicionado a três béqueres, 10mL de solução aquosa de alginato de sódio 2,5% (m/V) e, a cada béquer, sob agitação mecânica de 2000rpm, foi acrescentado o óleo de milho, contendo previamente solubilizado, quantidades crescentes de *p*-DMB (compreendendo 1,5%, 2,5% e 3,5% m/V de óleo), para formação de uma emulsão estável. As emulsões resultantes foram vazadas em moldes e deixadas ao ar, para evaporação da água. As misturas físicas (filmes) foram designadas por MF0%, MF1,5%, MF2,5% e MF3,5% e todas foram caracterizadas por técnicas como espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, difração de raios-X, calorimetria exploratória diferencial, análise termogravimétrica e microscopia eletrônica de varredura.

TABELA 5 - FORMULAÇÕES DE MISTURAS FÍSICAS (FILMES) PREPARADAS BASEADAS NAS FORMULAÇÕES DE MILIPARTÍCULAS DE ALGINATO DE CÁLCIO, SEM (MF0%) E CONTENDO *p*-DMB (MF1,5%, MF2,5%, MF3,5%)

| Misturas físicas | Solução de Alg-Na ^a (mL) | Óleo de milho (mL) | <i>p</i> -DMB (g) | <i>p</i> -DMB (%) (m/V) ^b |
|------------------|-------------------------------------|--------------------|-------------------|--------------------------------------|
| MF0% | 10 (0,25g) | 0,5 | 0,000 | 0 |
| MF1,5% | 10 (0,25g) | 0,5 | 0,008 | 1,5 |
| MF2,5% | 10 (0,25g) | 0,5 | 0,013 | 2,5 |
| MF3,5% | 10 (0,25g) | 0,5 | 0,018 | 3,5 |

^a SOLUÇÃO AQUOSA DE ALGINATO DE SÓDIO 2,5% (M/V)

^b COM RELAÇÃO AO VOLUME DE ÓLEO DE MILHO (0,5mL)

4.3.8. Avaliação da estabilidade das emulsões, não otimizadas, no preparo das milipartículas de alginato de cálcio

A estabilidade das emulsões contendo somente Tween 80, no preparo das formulações, foi avaliada a olho nú logo após o preparo e depois de 3 dias, quanto à separação de fases. As gotículas de óleo de milho disperso na fase aquosa de alginato de sódio foram vistas sob um microscópio ótico Olympus após o seu

preparo e suas imagens foram registradas por uma câmera fotográfica da marca Sony.

4.3.9. Testes de estabilidade e avaliação organoléptica das emulsões otimizadas

As emulsões estáveis, ou seja, sem separação de fases, foram avaliadas por meio de suas características organolépticas após 24 horas do seu preparo, na qual foram considerados parâmetros físicos como aspecto ou aparência das emulsões (ZANIN *et al.*, 2001). Dentre as características avaliadas foram consideradas: homogeneidade (sem separação de fases), brilho, macio (sem aspecto fibroso, presença de grumos), fino (fluida, não viscosa) e opacidade.

Foram realizados testes de estabilidade acelerados de curto prazo. Para os testes acelerados, a embalagem final adotada foi a de vidro a fim de evitar processos oxidativos nas emulsões. Todos os testes foram feitos em triplicata e após 24 horas do preparo de todas as formulações, período este necessário para que o sistema seja considerado estável (sem separação de fases) e necessário para que a emulsão contendo alginato de sódio em sua formulação, para preparo das milipartículas de alginato de cálcio, fique de repouso para remoção de bolhas, formadas durante o processo de agitação mecânica.

4.3.9.1. Testes de estabilidade acelerados a curto prazo

Nos testes de estabilidade acelerados a curto prazo, 3 frascos de vidro, contendo 1g das emulsões estáveis, foram postos em estufa a $50^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 72 horas, 3 frascos de vidro, contendo as mesmas emulsões estáveis (1g), foram colocados em geladeira a $-5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 72 horas e 1g das emulsões estáveis, colocadas em 3 frascos, foram submetidas à centrifugação durante 30 minutos a 3500 rpm à temperatura ambiente. Decorrido o tempo requerido, as características escolhidas e citadas anteriormente, para serem avaliadas, foram observadas.

4.3.9.2. Caracterização por microscopia ótica

A avaliação da estabilidade das emulsões estáveis, após 24 horas do seu preparo, do óleo de milho comercial foi realizada por meio de microscopia ótica (ZANIN *et al.*, 2002). As emulsões do óleo foram espalhadas sobre uma lâmina de vidro e, em seguida, uma lamínula foi posta sobre o material. Para visualização das amostras foi utilizado um microscópio ótico Olympus, com lentes objetivas de 4x e 10x. O registro das imagens ocorreu pela utilização de uma câmera fotográfica digital Sony.

4.4. CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS E MISTURAS FÍSICAS DE PHBV E ALGINATO

4.4.1. Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (IVTF)

As partículas de PHBV e alginato (sem otimização e otimizadas) carregadas com *p*-DMB e sem o mesmo, as de PHBV que passaram por processo de degradação, os polímeros PHBV e alginato de sódio puros, o *p*-DMB puro, óleo de milho comercial e as misturas físicas (filmes) PHBV/*p*-DMB e alginato/ *p*-DMB foram avaliados por espectroscopia na região do infravermelho entre 4000 cm⁻¹ e 400 cm⁻¹, em pastilha de KBr, em equipamento Excalibur Series FTS 3500GX, Bio-Rad Laboratories, 32 scans.min⁻¹, resolução de 4 cm⁻¹, no Departamento de Química (DQUI) da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

4.4.2. Análise de componentes principais (PCA)

Os espectros na região do infravermelho para as amostras de partículas de PHBV e alginato (otimizadas e sem otimização), polímeros puros, *p*-DMB e óleo de milho comercial, foram processados e avaliados empregando a ferramenta quimiométrica análise de componentes principais (PCA). Os espectros foram tratados no programa computacional MATLAB 6.5. Os dados obtidos por IVTF foram pré-processados, utilizando centrado na média e autoescalamento com a finalidade de adequar os dados e, ainda, remover possíveis fontes de variação.

4.4.3. Difração de raios-X (DRX)

Todas as amostras (partículas de PHBV e alginato contendo e sem o *p*-DMB e micropartículas de PHBV após passarem pelo processo de degradação, os polímeros puros, as misturas físicas de ambos os polímeros e o *p*-DMB) foram examinados em difratômetro de raios-X Shimadzu XRD-6000, scan de 2°/min e 2 θ de 5° a 50°, radiação K α do cobre ($\lambda=1.5418\text{\AA}$), corrente de 30 mA e voltagem 40 KV, para a observação de picos indicativos de cristalinidade e de regiões amorfas, além de possíveis alterações na cristalinidade do polímero PHBV puro (CANEVAROLO JR., 2004; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Estas análises foram realizadas no Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

4.4.4. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As análises por calorimetria exploratória diferencial das amostras de partículas de PHBV com e sem *p*-DMB antes e após o processo de degradação, das milipartículas de alginato otimizadas e sem otimização, contendo ou não o atraente

floral, das misturas físicas PHBV/*p*-DMB, dos polímeros PHBV e alginato de sódio puros e do *p*-DMB, foram feitas em equipamento Netzsch DSC 203 F1 MAIA. A programação de temperatura para as amostras de PHBV variou a uma faixa de temperatura de – 40 a 200 °C, com taxas de aquecimento e de resfriamento de 10°C.min⁻¹, sob fluxo de nitrogênio de 20mL.min⁻¹. A programação de temperatura foi correspondente primeiramente a uma rampa de aquecimento, partindo da temperatura ambiente até 200°C; resfriamento de 200°C a - 40°C e, novamente, rampa de aquecimento de – 40 até 200°C. Para a construção das curvas de DSC e avaliação dos resultados, foi utilizada a segunda rampa de aquecimento.

A programação de temperatura para as amostras de alginato variou à uma faixa de temperatura de 25 a 350°C, com taxas de aquecimento e de resfriamento de 10°C.min⁻¹ e 50°C.min⁻¹, respectivamente, sob fluxo de nitrogênio de 20mL.min⁻¹. A programação de temperatura foi correspondente primeiramente a uma rampa de aquecimento, partindo da temperatura ambiente até 200°C à uma taxa de 10°C.min⁻¹; resfriamento de 200°C à 25°C à uma taxa de 50°C.min⁻¹, uma segunda rampa de aquecimento de 25 a 200°C (10°C.min⁻¹); resfriamento de 200°C à 25°C à uma taxa de 50°C.min⁻¹ e terceira rampa de aquecimento de 25 a 350°C (10°C.min⁻¹). Para a construção das curvas de DSC e avaliação dos resultados, foi utilizada a terceira rampa de aquecimento.

A porcentagem de cristalinidade (%C) para as amostras de PHBV foi obtida por meio da Equação 1. ΔH_m é a variação da entalpia de fusão, e ΔH_m^0 é a variação da entalpia de fusão de uma amostra padrão considerada 100% cristalina (CANEVAROLLO JR, 2004). Neste caso, a amostra padrão considerada foi do polímero PHB. De acordo com a literatura, a variação da entalpia de fusão para o polímero PHB é 146 J/g (DERVAL *et al.*, 2000). Todas as análises foram realizadas no Departamento de Química (DQUI) da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

$$\%C = [\Delta H_m] / [\Delta H_m^0] \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

4.4.5. Análise termogravimétrica (TGA)

As análises termogravimétricas (TGA) das partículas de PHBV com e sem o *p*-DMB antes e após o processo de degradação, das milipartículas de alginato otimizadas e sem otimização, dos polímeros puros e do *p*-DMB foram realizadas em equipamento Netzsch TG 209. As análises das amostras de PHBV e alginato foram feitas em atmosfera oxidativa, a uma taxa de $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$, na faixa de temperatura de 25 a 800°C .

4.4.6. Análise de área superficial e diâmetro de poros por meio do método BET

As análises de área superficial e diâmetro de poros para as micropartículas de PHBV foram feitas por meio de adsorção-dessorção em nitrogênio líquido, seguindo o método de Brunauer-Emmet-Teller (BET). Os ensaios foram realizados em amostras pulverizadas, de granulometria controlada, em um equipamento Micrometrics ASAP (Accelerated Surface Area and Porosimetry) 2010. Previamente, as amostras foram degaseificadas e dessecadas à 110°C , em equipamento volumétrico, utilizando nitrogênio como gás de adsorção. As medidas de pressão foram feitas por barômetro capilar de mercúrio. Os resultados foram analisados pelo método BET. As análises foram realizadas no Instituto de Tecnologia para o Desenvolvimento (LACTEC).

4.4.7. Estudo morfológico e de superfície por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O estudo morfológico e de superfície das micropartículas de PHBV com e sem *p*-DMB antes e após passarem por processo de degradação, das milipartículas de alginato de cálcio e dos filmes obtidos com PHBV/*p*-DMB e alginato/ *p*-DMB, foi realizado por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras foram secas à temperatura ambiente e fixadas em suporte metálico. Em seguida, foram submetidas à metalização com ouro no equipamento Balzers Sputtering SCD-030. Para visualização das amostras foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM 6360 LV, com voltagens de aceleração de 15 kV. As imagens foram feitas no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

4.4.8. Análise de tamanho de partícula por meio de granulometria a laser

As análises da distribuição de tamanho (granulométrica) das micropartículas de PHBV contendo *p*-DMB e sem o mesmo (grupo controle) foram feitas em granulômetro a laser por espalhamento dinâmico de luz sendo que, preliminarmente, foi necessário preparar dispersões estáveis (turvas) das micropartículas em água deionizada, realizadas no próprio equipamento, com a ajuda de um ultrassom ativo, durante 60 segundos. Para calibrar o aparelho foi adicionada água deionizada (branco). Sabe-se que o equipamento opera sob uma faixa de detecção entre 0,04 e 500 μm . Para determinar a dispersão de tamanho das formulações (Span) foram usados os dados obtidos nestas análises e a Equação 2. As análises foram realizadas no Laboratório de Análise de Minerais e Rochas (LAMIR) – UFPR.

$$\text{Span} = d(v,90\%) - d(v,10\%) / d(v,50\%) \quad (\text{Equação 2})$$

Sendo : d = diâmetro das micropartículas e v = volume analisado.

4.5.DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (%) DO *p*-DMB PARA AS PARTÍCULAS DE PHBV E ALGINATO: MÉTODO DIRETO E INDIRETO

4.5.1.Método direto

A eficiência de encapsulação (%) do *p*-DMB incorporado nas micropartículas de PHBV designadas como MP9%, MP19% e MP40%, foi determinada, por método direto, por meio de espectrofotometria na região do ultravioleta e visível (UV-Vis) e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Já para as milipartículas de alginato de cálcio otimizadas e sem otimização somente a técnica do UV-Vis foi aplicada.

Para análise das amostras de PHBV, por espectrofotometria UV-Vis (Shimadzu), uma massa de micropartículas equivalente a 10mg de *p*-DMB foi pesada e solubilizada em clorofórmio (50mL) durante 24 horas. Decorridas 24 horas, a solução clorofórmica foi filtrada por meio de membrana Millipore de nylon de 0,45 μm .

Para as amostras de alginato, uma massa de milipartículas otimizadas e sem otimização, referente a 1mg de *p*-DMB foi suspensa em 10mL de uma solução aquosa de citrato de sódio dihidratado na concentração de $0,05\text{mol.L}^{-1}$ (SACCHETIN *et al.*, 2010), para obter a liberação do atraente floral incorporado, pela completa dissolução das partículas de alginato de cálcio (completa solubilização da amostra) (FIGURA 19).



FIGURA 19 – FOTO DA DISSOLUÇÃO DAS MILIPARTÍCULAS DE ALGINATO DE CÁLCIO EM SOLUÇÃO AQUOSA DE CITRATO DE SÓDIO DIHIDRATADO $0,05\text{mol.L}^{-1}$

As amostras foram mantidas nesta solução por 24 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, a solução contendo as micropartículas dissolvidas, foram extraídas com 10mL de clorofórmio. O volume da solução clorofórmica de atrante floral foi completado para 50mL em balão volumétrico.

As soluções resultantes foram analisadas por espectrofotometria na região do ultravioleta, na faixa de 400 a 200 nm, utilizando cubetas de quartzo de 1cm de caminho ótico. Para quantificação do *p*-DMB, por este método, foi necessário construir uma curva analítica utilizando cinco soluções clorofórmicas do *p*-DMB em uma faixa de concentração de $8,0 \times 10^{-5}$ a $3,0 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹. Com os valores de absorvância em 240 nm, obtido com as respectivas concentrações, foi construída a curva analítica. A concentração de *p*-DMB presente nas soluções resultantes da solubilização de uma massa conhecida de partículas foi obtida conhecendo os valores de absorvância das mesmas e por meio da lei de Lambert-Beer. A partir dos valores obtidos, foi determinada a porcentagem de encapsulação pela equação 3. Os ensaios foram realizados em duplicata.

$$\text{Eficiência de encapsulação (\%)} = \frac{\text{massa do } p\text{-DMB nas micropartículas}}{\text{massa inicial do } p\text{-DMB}} \times 100 \text{ (Equação 3)}.$$

Para a análise cromatográfica das amostras de PHBV, uma massa de micropartículas, correspondente à concentração de 100µg.mL⁻¹ foi pesada e o *p*-DMB foi extraído com 5mL de fase móvel constituída de 70:30 (V/V) metanol/água. As soluções resultantes foram filtradas por membrana Millipore (45µm) para separá-las do polímero PHBV dissolvido. O sobrenadante contendo o *p*-DMB foi, então, quantificado. O método foi validado de acordo com a sensibilidade (limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ)), linearidade, precisão e exatidão, pela construção de cinco curvas analíticas de faixa de concentração variando entre 1,125 e 200 µg.mL⁻¹. As curvas foram geradas ao plotar as concentrações do *p*-DMB versus a área obtida nos comprimentos de onda de 223 e 285 nm.

As soluções padrão e as soluções provenientes da extração das micropartículas foram analisadas sob condições isocráticas, com fase móvel composta por 70% de metanol em água ultrapura. O fluxo foi mantido em 0,8

mL.min⁻¹. A integração dos cromatogramas foi realizada empregando o software Empower 3.

Estes resultados foram comparados com os obtidos pelo método indireto, descrito a seguir, no qual a eficiência de encapsulação foi determinada pela quantidade de *p*-DMB não encapsulado, determinado na fase aquosa emulsionante (solução aquosa de PVA a 2% (m/V)).

4.5.2.Método indireto

A eficiência de encapsulação (%) do *p*-DMB (Equação 3) foi obtida para as formulações de PHBV MP(9%), MP(19%) e MP(40%) e para as de alginato de cálcio não otimizadas MP0%, MP1,5%, MP2,5% e MP3,5% pelo método indireto, por meio da quantificação do atraente floral presente nos sobrenadantes armazenados (soluções aquosas de PVA e de cloreto de cálcio – solução de reticulação), após centrifugação (solução aquosa de PVA) e filtração simples das milipartículas de alginato, provenientes de cada formulação. A determinação foi feita por espectrofotometria na região do ultravioleta, em espectrofotômetro (Shimadzu), na faixa de absorção de 400 a 200 nm, utilizando cubetas de quartzo de 1cm de caminho ótico. Para a quantificação do composto, presente nas soluções aquosas de PVA, foi elaborada uma curva analítica utilizando cinco soluções do *p*-DMB em uma faixa de concentração entre $5,0 \times 10^{-5}$ e $2,5 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹, em solução aquosa de poli(álcool vinílico) (PVA) a 2% (m/V), no qual os valores de absorvância máxima foram adquiridos em 223 nm. Para o preparo das soluções padrão foi, inicialmente, preparada uma solução de *p*-DMB na concentração de $1,57 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹ em solução aquosa de PVA. A partir desta solução estoque foram realizadas diluições, no total de cinco soluções padrão de volume final de 25 mL.

Para quantificação das soluções de cloreto de cálcio, estas foram extraídas com clorofórmio (50mL) em funil de separação. Para a quantificação do atraente floral, a curva analítica elaborada para o método direto, utilizando cinco soluções do *p*-DMB em uma faixa de concentração entre $8,0 \times 10^{-5}$ a $3,0 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹, em

clorofórmio, foi utilizada, no qual os valores de absorvância máxima foram adquiridos em 240nm.

A concentração do *p*-DMB nos sobrenadantes foi obtida conhecendo seus valores de absorvância. Por outro lado, a massa de atraente floral incorporado nas micropartículas de PHBV foi obtida determinando a massa deste presente em 75 mL de fase aquosa de PVA (sobrenadante) armazenada, sendo esta obtida por subtração da massa conhecida de *p*-DMB adicionada no preparo das formulações. As determinações para as amostras de PHBV foram realizadas em duplicata.

4.6. ENSAIOS DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* DO *p*-DMB PARA PARTÍCULAS DE PHBV E ALGINATO

Os ensaios de liberação *in vitro* do *p*-DMB, incorporado no interior das partículas de PHBV e alginato otimizadas e sem otimização foram conduzidos em câmara de aeração (FIGURA 20). As amostras, previamente preparadas, foram introduzidas em câmara de vidro e avaliadas a cada 24 horas, durante seis dias, para coleta do atraente floral.



FIGURA 20 - ESQUEMA DE UMA CÂMARA DE AERAÇÃO PARA ESTUDO DE LIBERAÇÃO DO *p*-DMB
(FONTE: ZARBIN *et al.*, 1999)

As formulações contendo o *p*-DMB foram colocadas no compartimento de aeração. Com o sistema em funcionamento, o fluxo de ar de entrada, previamente filtrado, foi capaz de arrastar o atraente floral até a outra extremidade em que se

encontra um polímero adsorvente (resina Super Q). A cada 24 horas de aeração, o sistema foi desligado e a coluna contendo a resina Super Q em que o *p*-DMB foi adsorvido, foi desconectada do sistema e lavada com metanol grau cromatográfico, para posterior análise em cromatografia em fase gasosa.

Segundo a literatura, a preferência por tal solvente deve-se à volatilidade do mesmo, o que possibilita a concentração da amostra coletada, o que retarda perdas do analito (TIBONE, 2007). As amostras coletadas foram armazenadas em vials de 1,5 mL de volume e à elas adicionada 100 μ L de solução metanólica do padrão interno benzoato de metila na concentração de 0,4 mg.mL⁻¹. Em seguida, as amostras foram injetadas no cromatógrafo em fase gasosa com detector de espectrometria de massas, para identificação e quantificação do composto. O método de adição de padrão interno às amostras foi utilizado na construção da curva de calibração. As concentrações das soluções padrão do atraente floral variaram em uma faixa de concentração entre 0,05 e 0,6 mg.mL⁻¹ (total de cinco soluções).

4.6.1. Cromatografia em fase gasosa – espectrometria de massas (CG- EM)

Um equipamento GCMS-QP2010 acoplado a um GC-2010 da Shimadzu, com injetor automático AOC-20i, foi utilizado para as análises dos ensaios de liberação do atraente floral *p*-dimetoxibenzeno. A coluna usada foi a Rtx5MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 μ m de espessura). As condições analíticas foram as seguintes: a coluna foi aquecida de 100 a 250°C a 5°C.min⁻¹ e mantida na temperatura máxima por 10 minutos. O fluxo gasoso foi mantido em 0,85mL.min⁻¹ para o gás hélio. A temperatura de injeção foi de 250°C enquanto que a temperatura na interface entre o cromatógrafo e o espectrômetro de massas foi mantida em 300°C. A ionização utilizada foi impacto de elétrons com uma voltagem de 70eV. O volume de amostra injetado foi de 1 μ L. As análises foram feitas no Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

4.7. PREPARO DE EXTRATOS A PARTIR DE PÓ DE PORONGO, CONTENDO CUCURBITACINAS

Para o preparo dos extratos contendo cucurbitacinas, a partir do pó de porongo (FIGURA 21), foram realizados dois tipos de extração: a frio e à quente sob refluxo.

Por sua vez, a extração a frio foi feita de duas maneiras distintas: A primeira consistiu de um extrator de Soxhlet, sendo este um método contínuo, que possui, como finalidade, maximizar a extração do soluto (pó de porongo). A segunda maneira foi de simples agitação magnética.



FIGURA 21 – FOTO DO PÓ DE PORONGO, OBTIDO DE FRUTOS VERDES PROVENIENTES DA ESPÉCIE *Lagenaria vulgaris* L.), UTILIZADO NO PREPARO DOS EXTRATOS

Para todos os tipos de extração realizados, uma massa conhecida de pó de porongo (10g) foi adicionada ao extrator ou ao béquer assim como ao balão acoplado ao sistema de refluxo. Etanol (50mL) 95% (V/V) foi adicionado. Após a primeira extração no Soxhlet, foi contabilizado um tempo de 2 horas de extração. Para o procedimento a frio sob agitação magnética um tempo de 2 horas também foi contabilizado. Sendo este o mesmo tempo para o processo de refluxo. O extrato obtido por extração a quente foi filtrado para coleta do sobrenadante contendo possíveis cucurbitacinas. Em seguida, os extratos foram postos para evaporação do solvente em capela à temperatura ambiente. Obtidos os extratos, as soluções estoque foram preparadas para cada tipo de extração.

4.7.1. Preparo das soluções estoque e padrão para cada extrato e determinação de cucurbitacinas

As soluções estoque para os três extratos foram preparadas a uma concentração de $0,5\text{mg.mL}^{-1}$ em fase móvel metanol/água 70:30. Diluições das soluções estoque ($0,5\text{mg.mL}^{-1}$) foram realizadas para obtenção das soluções padrão dos três extratos ($0,1\text{mg.mL}^{-1}$). Estas soluções também foram preparadas em metanol /água 70:30.

O método de calibração utilizado foi o de adição de padrão, no qual a cucurbitacina B dihidratada foi a escolhida como padrão. Este método consiste em adicionar quantidades conhecidas da substância que está sendo analisada sob quantidades conhecidas da amostra (COLLINS *et al.*, 1990) (TABELA 6). O método de adição de padrão foi empregado para quantificar cucurbitacinas nos extratos por meio da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As concentrações do padrão variaram entre $12\mu\text{g.mL}^{-1}$ e $50\mu\text{g.mL}^{-1}$.

TABELA 6 – SOLUÇÕES DE EXTRATOS, OBTIDOS À QUENTE E A FRIO, PREPARADAS EM FASE MÓVEL METANOL/ÁGUA 70:30 E COM A ADIÇÃO DE PADRÃO DE CUCURBITACINA B DIHIDRATADA, EM VOLUMES DIFERENTES E CRESCENTES, NA CONCENTRAÇÃO CONHECIDA DE $0,1\text{mg.mL}^{-1}$

| Soluções padrão | Solução extratos (μL)* | Volume fase móvel (μL) | Volume solução padrão (μL)** |
|-----------------|--|--|--|
| 1 | 200 | 200 | 0 |
| 2 | 200 | 150 | 50 |
| 3 | 200 | 100 | 100 |
| 4 | 200 | 50 | 150 |
| 5 | 200 | 0 | 200 |

*SOLUÇÕES DE CONCENTRAÇÃO $0,1\text{mg.mL}^{-1}$

**SOLUÇÃO DE CONCENTRAÇÃO $0,1\text{mg.mL}^{-1}$

Por meio dos cromatogramas obtidos para as cinco soluções de cada extrato, é possível construir uma curva analítica que relaciona as concentrações da cucurbitacina B dihidratada adicionada às amostras dos extratos com as respectivas

áreas. O ponto no qual a reta cortará o eixo das ordenadas (y) corresponde à área do pico da cucurbitacina a ser determinada nos extratos avaliados, sem qualquer adição do padrão. Já a extrapolação da reta, no eixo das abcissas (x), corresponde à concentração da substância na amostra analisada (COLLINS *et al.*, 1990). O método de adição de padrão é de grande importância quando a amostra a ser analisada é muito complexa.

4.7.2. Condições cromatográficas adotadas na determinação de cucurbitacinas

As soluções padrão de cada extrato foram analisadas sob condições de eluição isocráticas (composição constante da fase móvel), usando uma fase móvel composta de 70% metanol e 30% água ultrapura. O fluxo da fase móvel foi de 1,0 mL. min⁻¹. O volume de injeção para cada amostra foi de 20 µL. A absorbância foi monitorada na faixa entre 190 e 300nm. O tempo de cada corrida estabelecido foi de 6 minutos. O software EZChrom foi empregado para coletar os dados e analisar as corridas cromatográficas.

5.RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. MICROPARTÍCULAS DE PHBV CARREGADAS COM *p*-DMB E SUA DEGRADAÇÃO QUÍMICA

5.1.1. Preparo das micropartículas de PHBV pelo método de emulsão simples e evaporação do solvente

As suspensões aquosas de micropartículas sem o *p*-DMB (grupo controle, MP0%) e aquelas contendo o atraente floral em quantidades crescentes (MP9%, MP19% e MP40%) foram obtidas pelo método de emulsão simples seguida de evaporação do solvente, de acordo com a literatura (SENHORINI *et al.*, 2012; FARAGO *et al.*, 2008). Elas foram obtidas como um líquido de aspecto branco, leitoso (FIGURA 22). As concentrações das soluções de PHBV e de poli(álcool vinílico) (PVA) empregadas, foram obtidas com base em trabalhos anteriores desenvolvidos pelo grupo de pesquisa (FARAGO *et al.*, 2008) e as quantidades de atraente floral foram pré-estabelecidas na expectativa de investigar a relação entre aumento na concentração com o acréscimo no teor de *p*-DMB incorporado nas micropartículas.

Foi observado um forte odor do atraente floral utilizado, nas suspensões formuladas e, após centrifugação, o sobrenadante aquoso armazenado apresentou o mesmo odor característico do *p*-DMB. Por meio desta observação, é possível sugerir que parte do atraente ficou ligeiramente solúvel na solução aquosa de poli(álcool vinílico) (PVA) e a outra fração está encapsulada na forma de micropartículas (FIGURA 23). Para confirmação da incorporação nas micropartículas, todas as formulações obtidas foram caracterizadas por meio de técnicas convencionais como espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier, difração de raios-X, calorimetria exploratória diferencial, análise termogravimétrica, método de BET, microscopia eletrônica de varredura e granulometria a laser.



FIGURA 22 – ASPECTO DAS SUSPENSÕES AQUOSAS DE MICROPARTÍCULAS DE PHBV SEM E COM *p*-DMB



FIGURA 23 – ASPECTO DAS MICROPARTÍCULAS DE PHBV OBTIDAS APÓS CENTRIFUGAÇÃO DAS SUSPENSÕES PREPARADAS E SECAGEM DAS MESMAS

5.1.2. PREPARO DAS MISTURAS FÍSICAS (FILMES) PHBV/*p*-DMB

As misturas físicas (filmes) preparadas entre o PHBV e o *p*-DMB designadas como MF9%, MF19% e MF40%, contendo 9%, 19% e 40% (m/m) de atraente floral com relação à massa de polímero, foram obtidas como um filme heterogêneo, resistente ao rasgo e opalescente (FIGURA 24B, 24C e 24D). Paralelamente, um filme contendo apenas PHBV puro (MF0%) foi preparado a partir de uma solução de polímero a 5% (m/V) em clorofórmio (5 mL) para efeito comparativo. Diferentemente dos demais filmes, o filme do polímero puro apresentou-se homogêneo, pouco resistente ao rasgo e translúcido (FIGURA 24A). Estudos de tração não foram

realizados para medir essa resistência ao rasgo. Esta observação foi baseada única e simplesmente em rasgar com a mão o filme formado. Para efeito comparativo com as micropartículas preparadas, os filmes foram caracterizados pelas técnicas convencionais de análise anteriormente citadas.

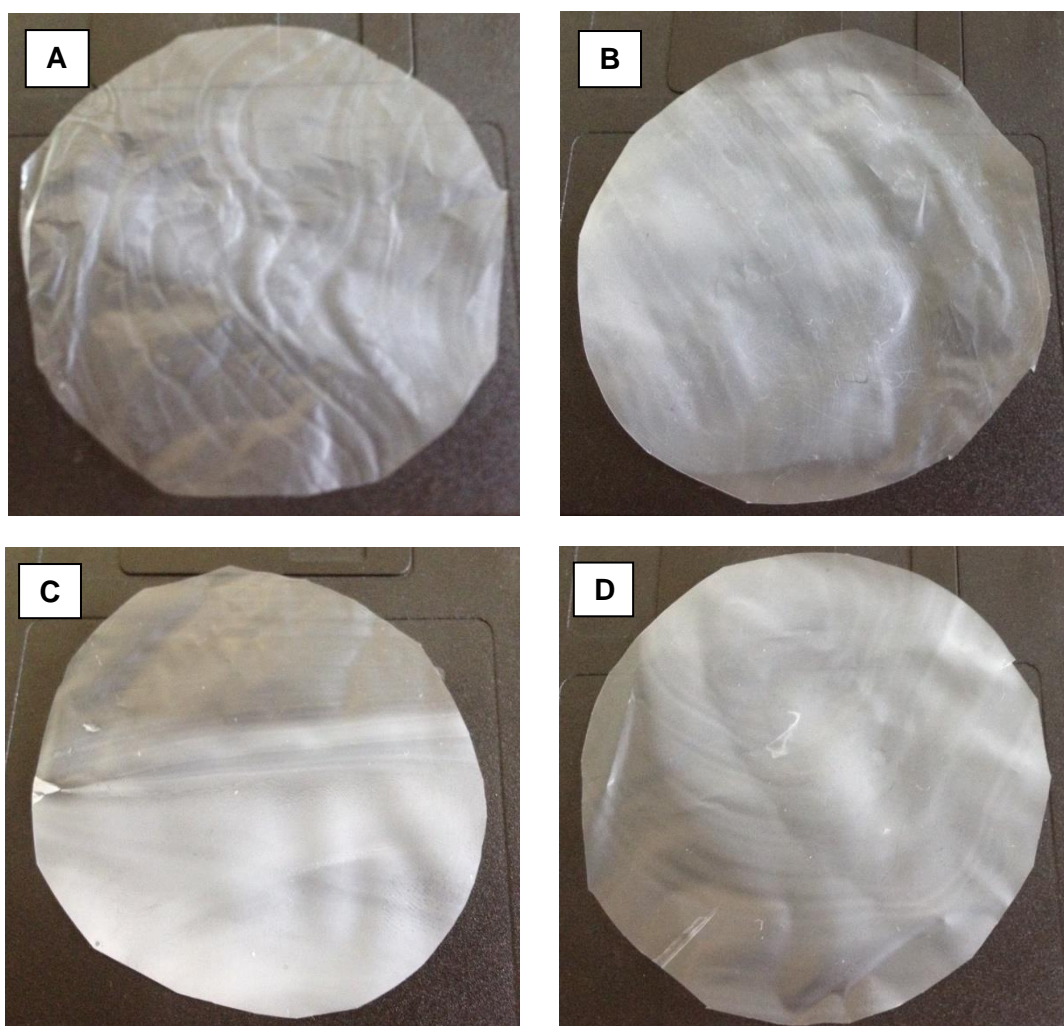


FIGURA 24 - FOTOGRAFIAS DAS MISTURAS FÍSICAS (FILMES) PHBV/P-DMB: (A) MF0% (PHBV PURO), (B) MF9% (m/m), (C) MF19% (m/m) E (D) MF40% (m/m)

5.1.3. AVALIAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS DE PHBV SEM *p*-DMB APÓS O PROCESSO DE DEGRADAÇÃO QUÍMICA

5.1.3.1. Análise por infravermelho com transformada de Fourier (IVTF)

O espectro das micropartículas sem *p*-DMB (0 dia) (FIGURA 25) mostrou bandas características da composição química do polímero PHBV, como a deformação axial simétrica de C-H em 2985cm^{-1} , a deformação axial simétrica de ésteres alifáticos (C=O) saturados em 1739cm^{-1} , a deformação axial assimétrica C-H em 1461cm^{-1} , a deformação angular de C-H referente aos grupamentos metila $-\text{CH}_3$ em 1384cm^{-1} e deformação axial simétrica correspondente ao grupamento C-O-C de ésteres saturados entre 1200cm^{-1} e 1100cm^{-1} (SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

Ao analisar os espectros das micropartículas após o processo de degradação química (10, 20, 30, 40 e 50 dias) (FIGURA 25), foi observado um ligeiro deslocamento da banda referente aos ésteres alifáticos saturados de 1739 para 1730cm^{-1} .

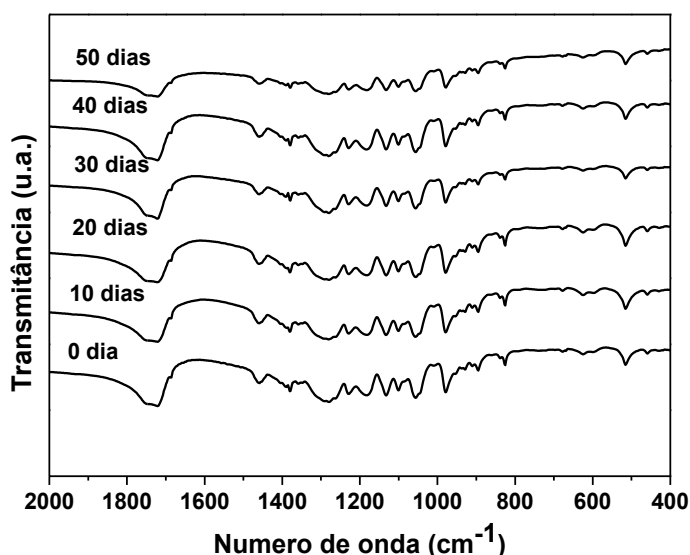


FIGURA 25 – ESPECTROS NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER PARA AS MICROPARTÍCULAS DE PHBV SEM *p*-DMB, ANTES E APÓS PASSAREM PELO PROCESSO DE DEGRADAÇÃO QUÍMICA

De acordo com a literatura e com base nos espectros apresentados, é possível dizer que a estrutura química do PHBV, na forma de micropartículas, não foi alterada. Isto porque pelos espectros avaliados podem ser observadas as bandas características do PHBV, antes de passar pelo processo de degradação (WENG *et al.*, 2010).

Segundo LUO e NETRAVALI (2003), o decréscimo na intensidade e alteração nas formas das bandas do PHBV são sensíveis ao grau de cristalinidade. E que o decréscimo na intensidade de bandas foi relacionado com o decréscimo na cristalinidade do polímero. Portanto, os dados obtidos por infravermelho, não confirmam com certeza que ocorreu degradação das micropartículas de PHBV, já que não foi observado surgimento de banda de hidroxila em 3500 cm^{-1} e não foi observado decréscimo ou até mesmo alteração no formato das bandas para as amostras avaliadas.

5.1.3.2. Medidas de cristalinidade por difração de raios-X (DRX)

Os difratogramas apresentados (FIGURA 26) mostraram picos estreitos de cristalinidade do PHBV e alguns mais alargados, os quais indicam que há regiões amorfas no polímero.

Quando o perfil do difratograma das micropartículas, antes de passarem pelo processo de degradação, foi comparado com os das outras amostras após processo de hidrólise ácida (10, 20, 30, 40 e 50 dias) (FIGURA 26), foi possível observar a perda na cristalinidade para a amostra de 50 dias.

Além disso, para a amostra de 50 dias ocorreu o aparecimento de vários picos mais alargados, indicando que ocorreu um aumento de novas regiões amorfas nesta amostra. Estes halos amorfos estão representados por toda faixa de 2θ avaliada.

Ainda na amostra de 50 dias (FIGURA 26) foi possível observar que o halo amorfo em aproximadamente 21° desapareceu, o que significa que o processo de degradação se inicia nas regiões amorfas, estas de acesso mais fácil.

A diferença no perfil do difratograma da amostra de 50 dias com os demais pode ser explicado pelo fato das regiões cristalinas e amorfas da amostra de 50 dias

terem sido expostas ao tampão ligeiramente ácido mais significativamente em seu interior (devido ao maior tempo em contato com essa solução), tornando esta amostra tão diferente das demais.

Portanto, pela análise de DRX é possível afirmar que as micropartículas de PHBV sofreram processo de degradação química em pH 5,6. Essa mesma constatação não pôde ser feita pela análise dos espectros no infravermelho. O que pode ser explicado pela conversão de alguns grupamentos éster, na molécula do polímero, em moléculas de álcoois e ácidos pequenas o suficiente para serem solubilizadas na solução aquosa do tampão e assim serem eliminadas no processo de lavagem e filtração das amostras em questão.

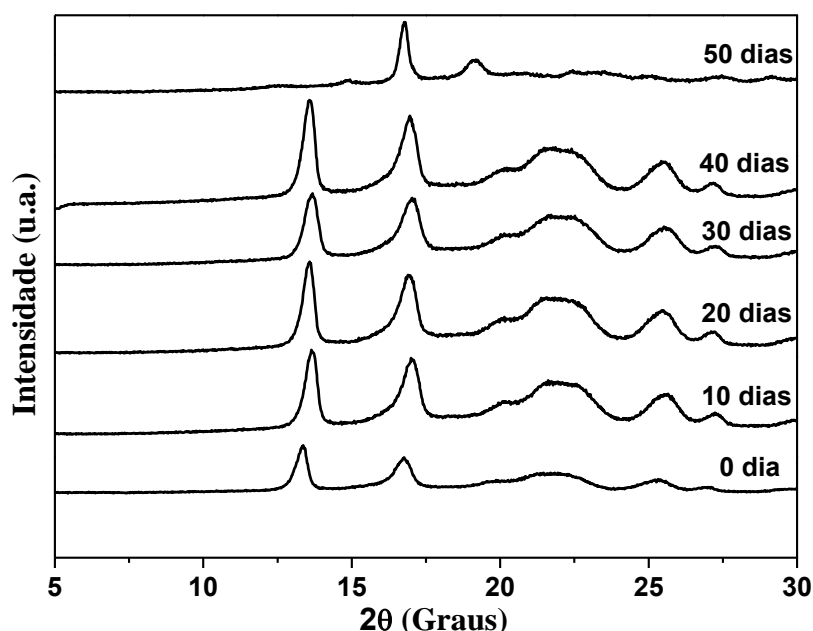


FIGURA 26 - DIFRATOGRAMAS DAS MICROPARTÍCULAS DE PHBV ANTES E APÓS PROCESSO DE DEGRADAÇÃO QUÍMICA SOB PH 5,6 À TEMPERATURA AMBIENTE

5.1.3.3. Análise térmica por calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Por meio das curvas de DSC (FIGURA 27), foi possível detectar que as micropartículas estudadas sofreram degradação química, por meio da hidrólise ácida, baseado nos valores obtidos para a temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura de cristalização (T_c) e a temperatura de fusão (T_m) quando comparados

com os valores apresentados para a amostra antes de passar pelo processo de degradação (0 dia) (TABELA 7).

Os dados apresentados na TABELA 7 são com relação à segunda rampa de aquecimento e, por meio deles, foi possível observar que ocorreu redução na temperatura de transição vítrea (T_g) quando comparadas as amostras de 0 e 10 dias, enquanto que as demais permaneceram com os valores praticamente constantes. O decréscimo na T_g significa que energia menor foi necessária para movimentar as cadeias poliméricas umas sobre as outras para as amostras degradadas.

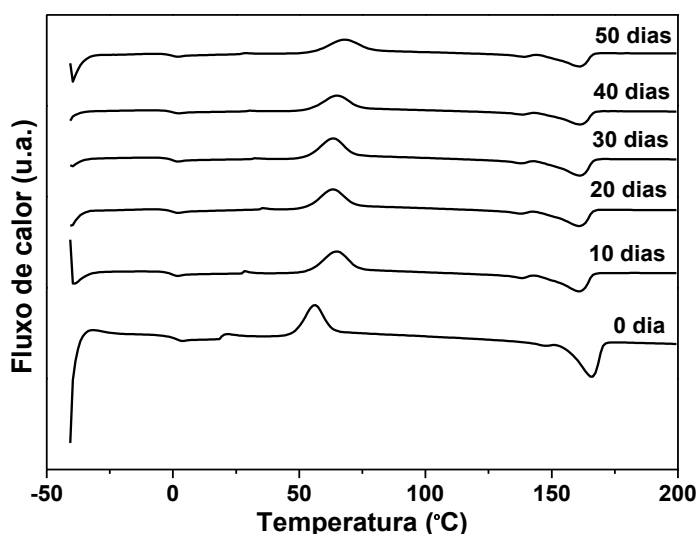


FIGURA 27 – CURVAS DE DSC OBTIDAS E AVALIADAS PARA AS MICROPARTÍCULAS DE PHBV ANTES (0 DIA) E APÓS PROCESSO DE DEGRADAÇÃO (10, 20, 30, 40 E 50 DIAS)

TABELA 7 - DADOS OBTIDOS POR MEIO DAS CURVAS DE DSC DAS MICROPARTÍCULAS DE PHBV ANTES E APÓS DEGRADAÇÃO: TEMPERATURA DE TRANSIÇÃO VÍTREA (T_g), TEMPERATURA DE CRISTALIZAÇÃO (T_c), TEMPERATURA DE FUSÃO (T_m), VARIAÇÃO DE ENTALPIA DE FUSÃO (ΔH_m) E PORCENTAGEM DE CRISTALINIDADE (C)

| Amostras | T_g (°C) | T_c (°C) | T_m (°C) | ΔH_m (J.g ⁻¹) | C (%) |
|----------|------------|------------|------------|-----------------------------------|-------|
| 0 dia | 1,3 | 56 | 166 | 37 | 25 |
| 10 dias | -0,3 | 65 | 161 | 33 | 22 |
| 20 dias | -0,4 | 63 | 161 | 31 | 21 |
| 30 dias | -0,1 | 63 | 161 | 28 | 19 |
| 40 dias | -0,1 | 65 | 161 | 30 | 20 |
| 50 dias | -0,6 | 68 | 161 | 25 | 17 |

NOTA: ESTUDO REALIZADO EM DUPLICATA PARA CADA CONDIÇÃO (N=2). TAXA DE AQUECIMENTO E RESFRIAMENTO DE 10°C.min⁻¹. DESVIO PADRÃO PARA CADA AMOSTRA FOI DE APROXIMADAMENTE $\pm 0,3$

Além disso, pelos valores de temperatura de fusão (T_m) foi observado um decréscimo nas temperaturas das mesmas amostras com relação à amostra antes de passar por processo de degradação (0 dia), o que torna necessária uma quantidade de energia menor para promover a fusão das micropartículas (ΔH_m) como mostrado na TABELA 7. O decréscimo observado para os valores de variação de entalpia de fusão (ΔH_m) pode ser atribuído à degradação química da região cristalina.

A variação dos valores de temperatura de transição vítrea (T_g), variação de entalpia de fusão cristalina (ΔH_m) e cristalinidade (C) indica que a degradação química promoveu decréscimo na cristalinidade do polímero, consumindo, desta forma, primeiramente as regiões amorfas (diminuição nos valores de T_g), de fácil acesso e logo em seguida as regiões cristalinas (LUO e NETRAVALI, 2003).

As temperaturas de cristalização (T_c) foram aumentadas com relação à amostra não degradada, o que nos leva dizer que é necessário liberar uma quantidade de calor maior para que ocorra o processo de formação de cristalitos no sistema estudado (CANEVAROLO JR, 2004). Os dados obtidos por calorimetria exploratória diferencial estão de acordo aos apresentados por difração de raios-X.

5.1.3.4. Análise termogravimétrica (TGA)

Pela análise termogravimétrica foi possível observar que a estabilidade térmica das amostras (10, 20, 30, 40 e 50 dias) foi alterada quando comparada com a amostra controle (0 dia) e que as amostras perderam massa em uma única etapa (FIGURA 28 e 29). Enquanto que a amostra de micropartículas de PHBV, antes de passar por processo de degradação (0 dia), apresentou estabilidade até a temperatura de 295°C, quando começou a perder massa, as demais tiveram sua

estabilidade aumentada (10 dias - 298°C; 20 dias - 302°C; 30 dias - 300°C; 40 dias - 303°C e 50 dias - 305°C) (TABELA 8).

Este aumento na estabilidade térmica pode ser explicado pela degradação preferencial às regiões amorfas, de fácil acesso à ação da solução tampão, em detrimento ao acesso às regiões cristalinas no polímero. A maior presença de fase cristalina influencia no aumento da temperatura de degradação das amostras.

A amostra controle (0 dia) perdeu $\Delta m=99\%$ de sua massa inicial, em uma única etapa, na temperatura de 295°C. As demais amostras perderam também massa em uma etapa (10 dias – $\Delta m=95\%$; 20 dias – $\Delta m=98\%$; 30 dias – $\Delta m=96\%$; 40 dias – $\Delta m=99\%$ e 50 dias – $\Delta m=99\%$) (TABELA 8).

Estes dados estão de acordo com os apresentados por calorimetria exploratória diferencial, o que sugere que as amostras são degradadas preferencialmente em suas regiões amorfas e posteriormente nas cristalinas, o que justifica a variação na estabilidade térmica das amostras avaliadas.

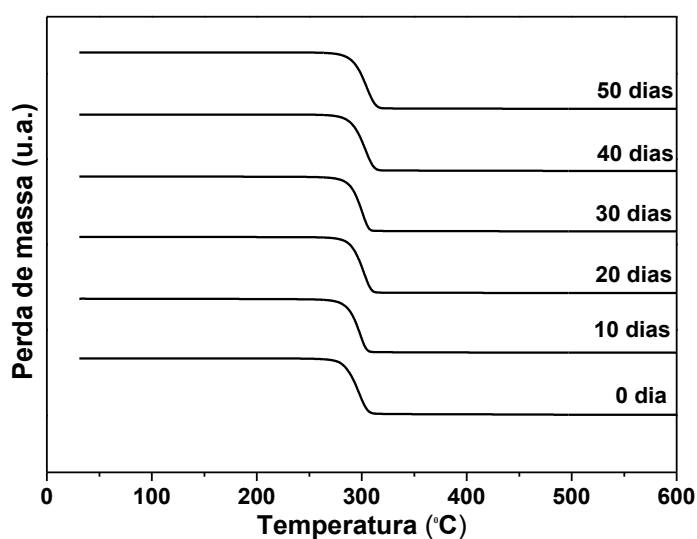


FIGURA 28 – CURVAS DE ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA) DAS AMOSTRAS DE MICROPARTÍCULAS DE PHBV SEM *p*-DMB, ANTES E APÓS PASSAREM PELO PROCESSO DE DEGRADAÇÃO QUÍMICA

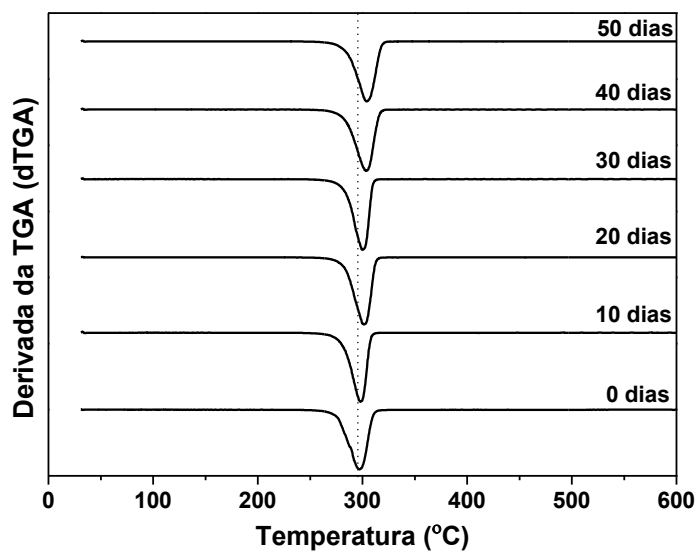


FIGURA 29 – GRÁFICOS DA PRIMEIRA DERIVADA DAS CURVAS DE ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA), DE TEMPERATURAS DE ESTABILIDADE TÉRMICA E PORCENTAGEM DE PERDA DE MASSA PARA AS AMOSTRAS DE MICROPARTÍCULAS DE PHBV, ANTES E APÓS PASSAREM PELO PROCESSO DE DEGRADAÇÃO

TABELA 8 – VALORES OBTIDOS PELAS CURVAS DE ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA), DE TEMPERATURAS DE ESTABILIDADE TÉRMICA E PORCENTAGEM DE PERDA DE MASSA PARA AS AMOSTRAS DE MICROPARTÍCULAS DE PHBV SEM *p*-DMB, ANTES E APÓS PASSAREM POR PROCESSO DE DEGRADAÇÃO

| Amostras | T_i (°C) | $T_{máx}$ (°C) | T_f (°C) | $\Delta m(\%)*$ |
|----------|------------|----------------|------------|-----------------|
| 0 dia | 268 | 295 | 314 | 100 |
| 10 dias | 271 | 298 | 310 | 95 |
| 20 dias | 273 | 302 | 316 | 98 |
| 30 dias | 273 | 300 | 311 | 96 |
| 40 dias | 271 | 303 | 319 | 99 |
| 50 dias | 271 | 305 | 324 | 99 |

*VARIACÃO DE PORCENTAGEM DE MASSA PERDIDA

5.1.3.5. Efeitos da degradação na morfologia das micropartículas

A morfologia e superfície das micropartículas foram ligeiramente alteradas após os experimentos de degradação. A forma das micropartículas de PHBV se tornou irregular quando degradadas por 50 dias.

Além disso, a superfície da amostra degradada por 50 dias mostrou ligeira perda de rugosidade e porosidade, propriedades estas observadas nas micropartículas de PHBV antes de ocorrer o processo de degradação (FIGURA 30A-C). É possível observar na amostra após 50 dias de degradação química, a presença de fibras quando comparada à amostra original (FIGURA 31A-C) o que significa que ocorreu processo de degradação nesta amostra. As amostras (10, 20, 30 e 40 dias) não apresentaram mudanças significativas (fotomicrografias não apresentadas).

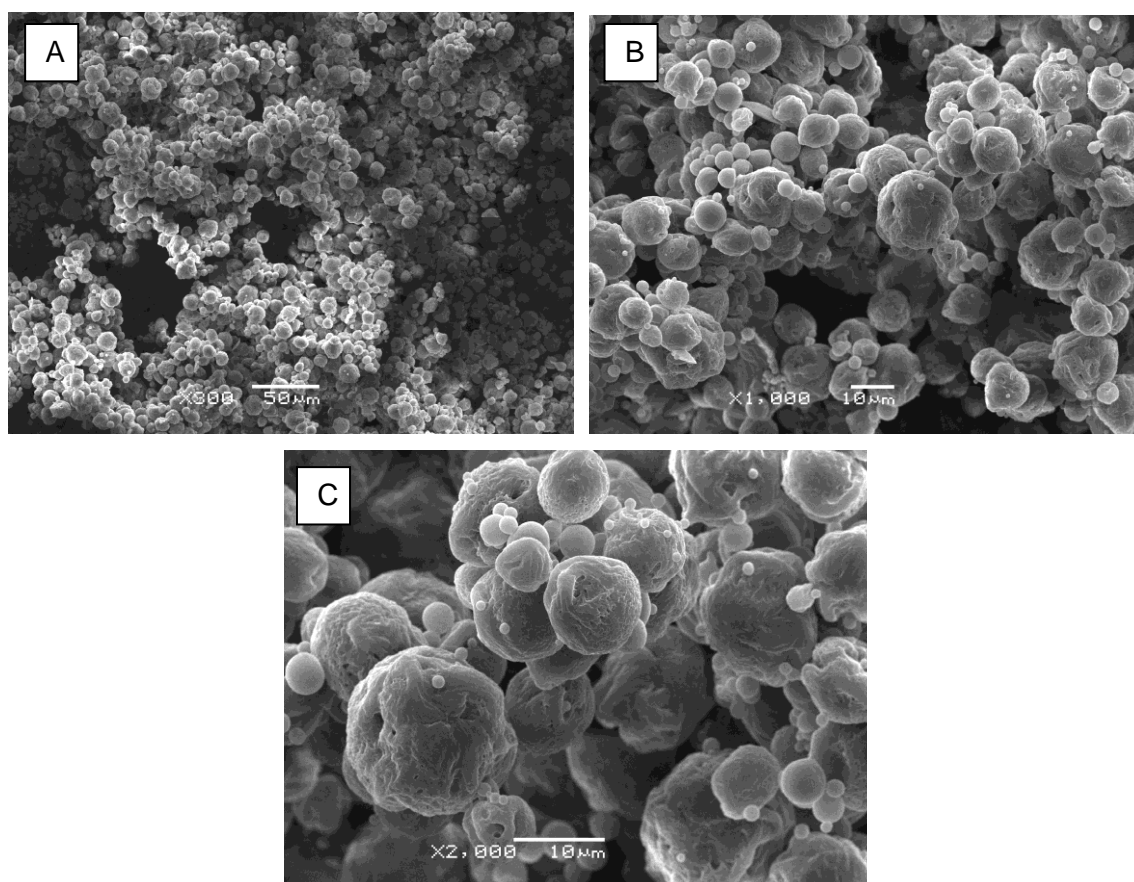


FIGURA 30: FOTOMICROGRAFIAS DAS MICROPARTÍCULAS DE PHBV SEM *p*-DMB ANTES DO PROCESSO DE DEGRADAÇÃO (0 DIA), EM DIFERENTES AUMENTOS: (A) – 300X, (B) – 1KX E (C) – 2KX

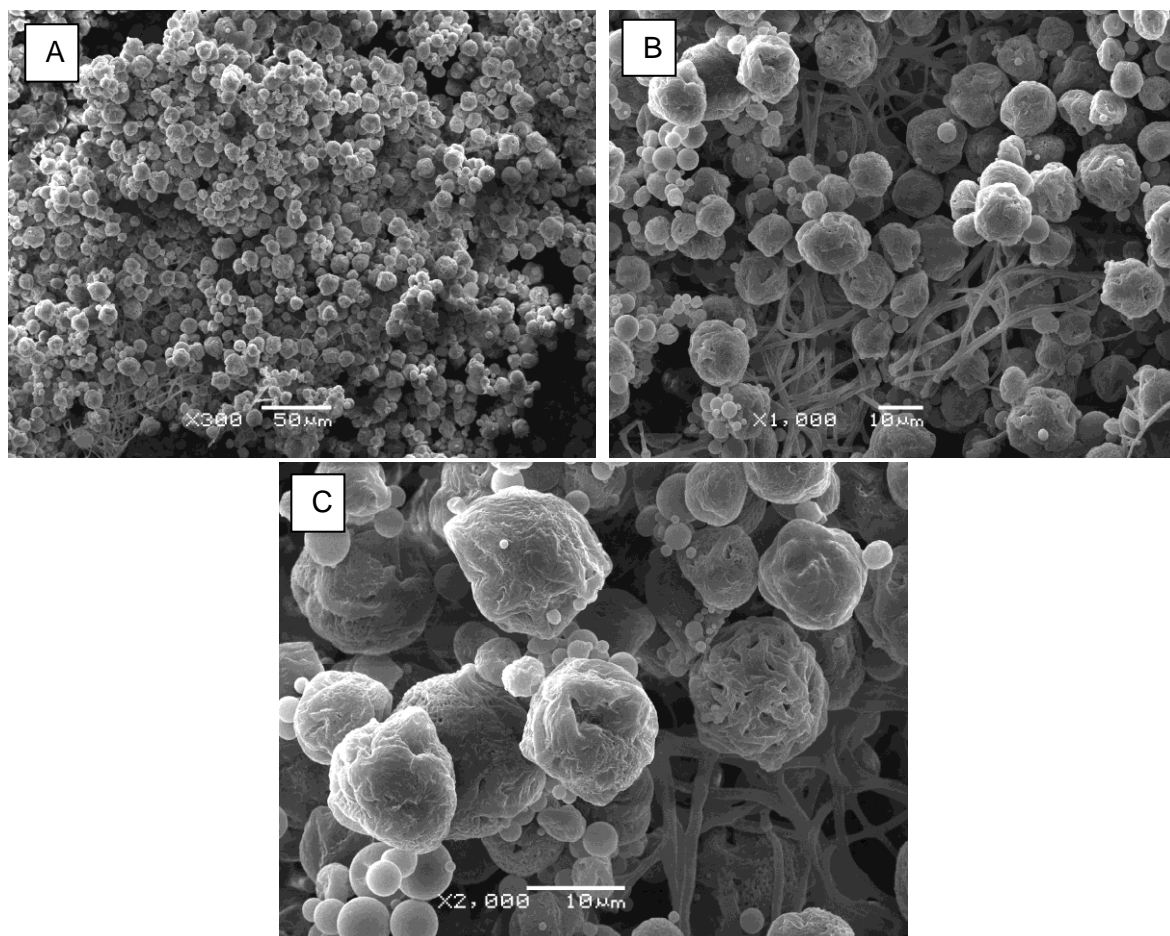


FIGURA 31: FOTOMICROGRAFIAS DAS MICROPARTÍCULAS DE PHBV SEM *p*-DMB APÓS PROCESSO DE DEGRADAÇÃO (50 DIAS), EM DIFERENTES AUMENTOS: (A) – 300X, (B) – 1KX E (C) – 2KX

5.1.3.6. Perda de massa (avaliação gravimétrica) das amostras

A FIGURA 32 mostra a perda de massa nas amostras de micropartículas de PHBV estudadas, em função do tempo de degradação (até 50 dias), com relação às condições adotadas nos estudos de degradação química. É evidente que ocorreu degradação das amostras estudadas. As amostras de 40 e 50 dias perderam menos massa que a amostra de 30 dias (FIGURA 32).

Esta observação pode ser explicada pela maneira como as cadeias poliméricas, na forma de micropartículas, foram hidrolisadas. É possível sugerir que as cadeias poliméricas das amostras de 40 e 50 dias foram convertidas em álcoois e ácidos orgânicos de cadeia carbônica grande o suficiente para não se dissolver na

solução tampão. Portanto, estes produtos da hidrólise ácida são contabilizados na medida da massa final.

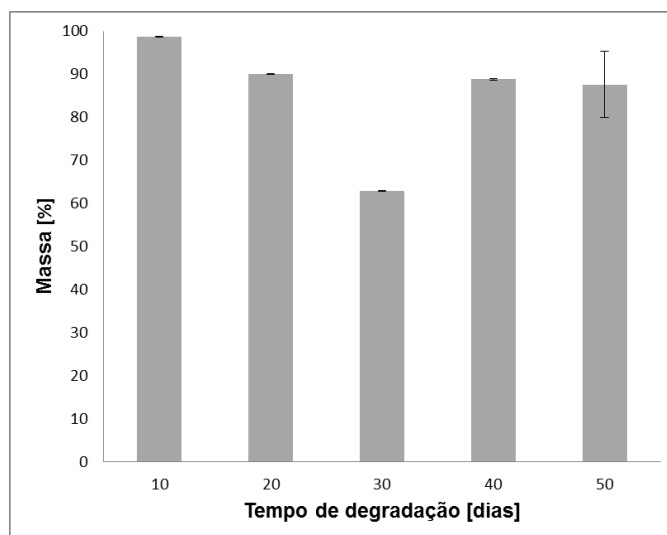


FIGURA 32 – MASSA EM PORCENTAGEM VERSUS O TEMPO DE DEGRADAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS DE PHBV NO MEIO TAMPÃO PH 5,6. (ENSAIO FEITO EM DUPLICATA N=2)

A degradação química, por meio da hidrólise ácida, em que as micropartículas de PHBV sem *p*-DMB foram submetidas, ocorreu com base na avaliação dos resultados obtidos. É possível sugerir que a degradação hidrolítica se inicia na superfície das partículas. Por meio deste estudo, será possível avaliar como a liberação do *p*-DMB ocorre, por difusão e/ou degradação.

5.2.CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS DE PHBV E DAS MISTURAS FÍSICAS PHBV/*p*-DMB

5.2.1. Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (IVTF)

A análise por IVTF do *p*-DMB (FIGURA 33) mostrou bandas características do atraente floral, referentes aos grupos funcionais presentes em sua estrutura como a deformação axial de C-H de aromáticos em 3067cm^{-1} , 3030cm^{-1} e 3005cm^{-1} .

Deformação axial simétrica C=C de aromático que se estende e contrai em fase entre 1450 e 1600cm^{-1} , a deformação axial simétrica de C-O de éter aromático na região de 1220cm^{-1} e deformação axial simétrica de C-O-C de éter na região de 1046cm^{-1} (SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

Os espectros das micropartículas de PHBV sem o atraente floral (MP0%) (grupo controle), aqui não apresentado, assim como o do polímero PHBV puro (FIGURA 33) mostraram perfis semelhantes com bandas características de sua composição, como a deformação axial de C-H em 2987cm^{-1} , a deformação axial de ésteres alifáticos (C=O) saturados em 1732cm^{-1} , a deformação assimétrica C-H em 1454cm^{-1} , a deformação angular de C-H referente aos grupamentos metila CH_3 em 1389cm^{-1} , deformação correspondente aos C-O-C de ésteres saturados entre 1200cm^{-1} e 1100cm^{-1} , além da deformação angular no plano de C-H em 1059cm^{-1} . (SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

As micropartículas de PHBV contendo o atraente floral, designadas como MP9%, MP19% e MP40% (FIGURA 33), apresentaram bandas resultantes da sobreposição das observadas nos espectros de infravermelho do polímero PHBV e do *p*-DMB puro. As bandas destacadas entre 1301 e 1046cm^{-1} das micropartículas contendo o atraente floral mostraram-se mais intensas e semelhantes ao composto puro. Esta observação sugere que há nas micropartículas tanto o *p*-DMB como o polímero PHBV. Não foi observado o aparecimento de uma nova banda de absorção que não esteja presente no polímero e no atraente floral.

Observa-se, destacado nos espectros para as micropartículas contendo o *p*-DMB, um aumento na intensidade das bandas em 1301cm^{-1} e 1046cm^{-1} , referente à deformação axial assimétrica e simétrica de C-O-C de éter, respectivamente.

Para confirmação das observações levantadas anteriormente, foi aplicado aos dados de espectroscopia no infravermelho, uma ferramenta quimiométrica conhecida como análise dos componentes principais (PCA). Esta ferramenta só foi utilizada para o PHBV puro, o *p*-DMB puro e as micropartículas contendo o atraente floral.

Este mesmo comportamento de sobreposição, aumento na intensidade e aparecimento de bandas do atraente floral foram evidenciados pela avaliação dos espectros no infravermelho para as misturas físicas analisadas entre PHBV/atraente floral (FIGURA 34). Os resultados de infravermelho sugerem a encapsulação do *p*-DMB.

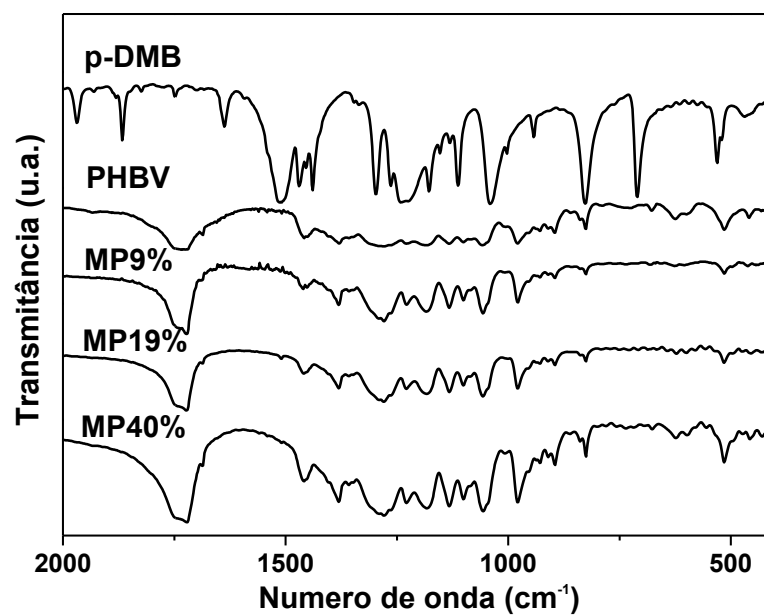


FIGURA 33 - ESPECTROS NO INFRAVERMELHO PARA O *p*-DMB, PHBV PURO E PARA AS MICROPARTÍCULAS CONTENDO O ATRAENTE FLORAL DESIGNADAS COMO MP9%, MP19% E MP40%

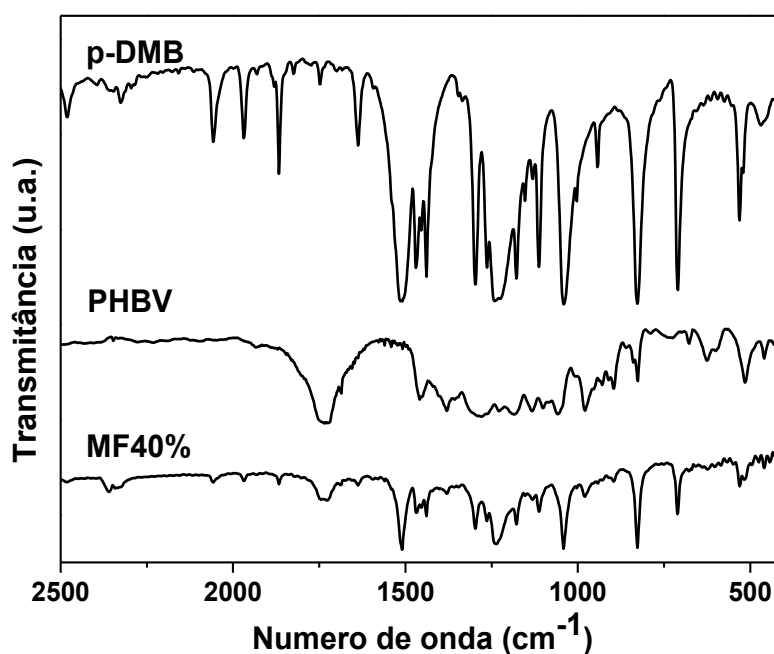


FIGURA 34 - ESPECTROS NO INFRAVERMELHO PARA O *p*-DMB, PHBV PURO E PARA A MISTURA FÍSICA CONTENDO O ATRAENTE FLORAL DENOMINADA DE MF40%

5.2.2. Análise de componentes principais (PCA) aplicada aos espectros no infravermelho

A análise de componentes principais foi aplicada aos espectros no infravermelho para todas as amostras avaliadas: o *p*-DMB, o polímero PHBV e as três formulações de micropartículas feitas com quantidades diferentes e crescentes do atraente floral. Todas as amostras foram avaliadas em triplicata, obtendo-se um total de 15 espectros. Uma matriz com os dados espectrais foi tratada, sendo obtido um sistema com duas componentes principais (PC1 e PC2) que explicam 96,11% da variância dos dados originais.

A terceira componente principal (PC3), que explica 2,25% dos dados originais, foi considerada irrelevante para a interpretação dos dados apresentados.

Os dados originais foram previamente pré-processados por autoescalamento e centrados na média. O autoescalamento é utilizado com a finalidade de garantir que todas as variáveis consideradas contribuam igualmente para a análise, independente da escala. Enquanto que o pré-processamento centrado na média é mais empregado para dados espectrais e todas as médias são colocadas em zero.

A FIGURA 35 mostra o gráfico de scores das componentes principais PC1 versus PC2. Este gráfico é útil para estudar a inter-relação entre amostras avaliadas. A primeira componente principal (PC1), que explica 81,69% da variância dos dados, é responsável por diferenciar as amostras de micropartículas de PHBV pela quantidade de polímero presente. Enquanto a segunda componente principal (PC2), que explica 14,42% da variância dos dados, mostra a variação na concentração de *p*-DMB adicionado em cada formulação.

Na componente principal PC1 é possível observar que as amostras do *p*-DMB (1, 2 e 3) apresentaram valores negativos, contrastando com as amostras de polímero puro (4, 5 e 6). Já com relação às micropartículas de PHBV contendo o atraente floral, foi possível observar que as formulações contendo uma menor quantidade de *p*-DMB designadas como 7, 8 e 9, apresentaram valores de PC1 positivos assim como o polímero PHBV, o que é de se esperar pela menor concentração do composto na formulação. As formulações contendo 19% e 40% de *p*-DMB com relação à massa de polímero, designadas como 10, 11, 12 e 13, 14, 15, respectivamente, mostraram valores de PC1 negativos assim como o composto puro

indicando uma maior concentração de atraente floral nestas formulações.

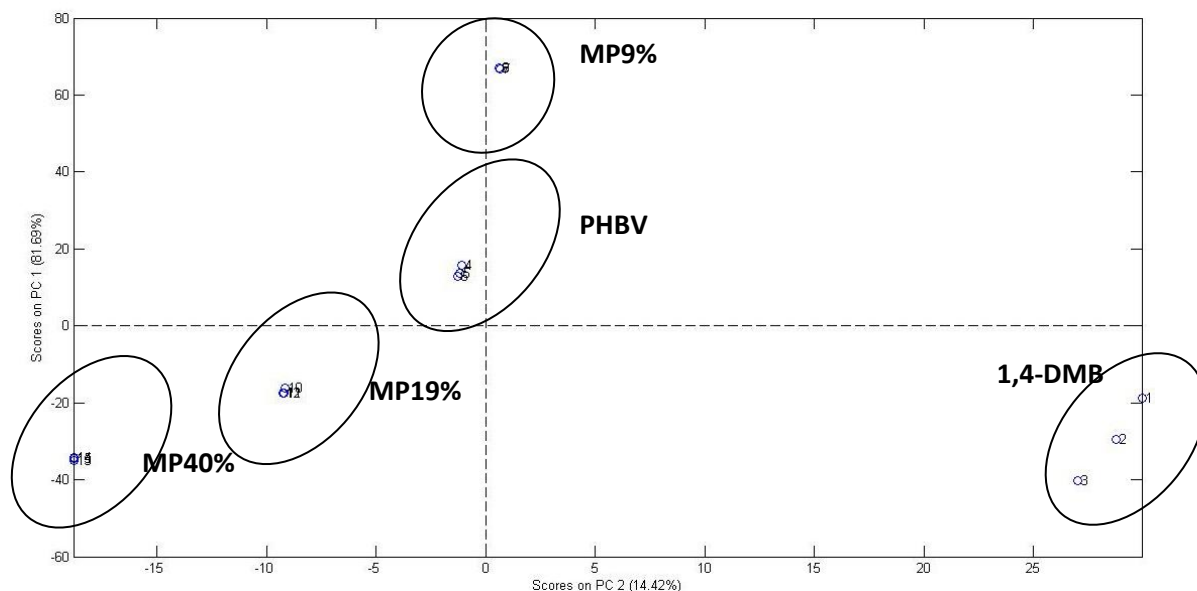


FIGURA 35 - GRÁFICO DE SCORES PARA O *p*-DMB, PHBV PURO E MICROPARTÍCULAS CONTENDO O ATRAENTE FLORAL

Pelo gráfico de loadings da PC1 e da PC2 (FIGURA 36 e 37, respectivamente), é possível interrelacionar as variáveis estudadas.

Para a PC1 (FIGURA 36) tem-se como variável importante a linha 687 que corresponde à banda em 1722cm^{-1} , característico de deformação axial simétrica de carbonila de éster. Enquanto que, no gráfico de loadings para PC2 (FIGURA 37), as variáveis importantes, correspondentes às linhas 572 e 643, são as bandas em 1500cm^{-1} e 1637cm^{-1} , respectivamente. A banda em 1500cm^{-1} é característica da deformação axial simétrica C=C de anel aromático. Logo, a PC1 faz o reconhecimento de padrões de acordo com o polímero PHBV nas formulações e a PC2 faz uma análise exploratória dos dados com relação ao atraente floral. É possível dizer que tanto o polímero como o atraente floral estão presentes nas formulações. Portanto, o *p*-DMB foi encapsulado.

A encapsulação do atraente floral pode ser afirmada já que a ferramenta quimiométrica de análise de componentes principais (PCA) considera a correlação de muitas variáveis analisadas simultaneamente (diversos números de onda nos espectros no infravermelho), permitindo a extração de uma quantidade muito maior

de informação (De Sena *et al.*, 2000).

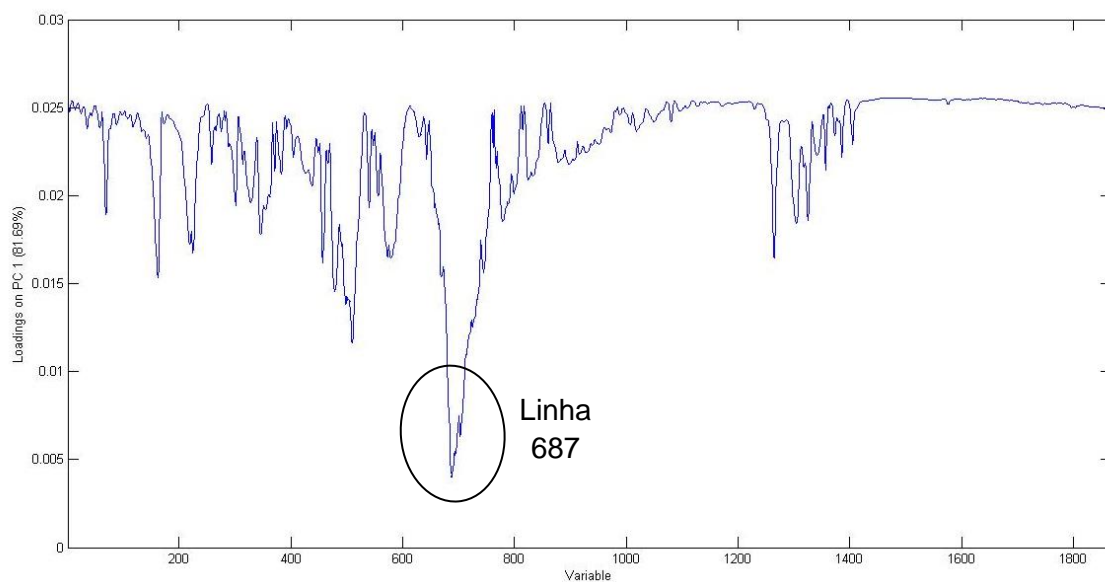


FIGURA 36 - GRÁFICO DE LOADINGS PARA COMPONENTE PRINCIPAL UM (PC1) QUE REPRESENTA AS BANDAS SIGNIFICATIVAS PARA O POLÍMERO PHBV PURO

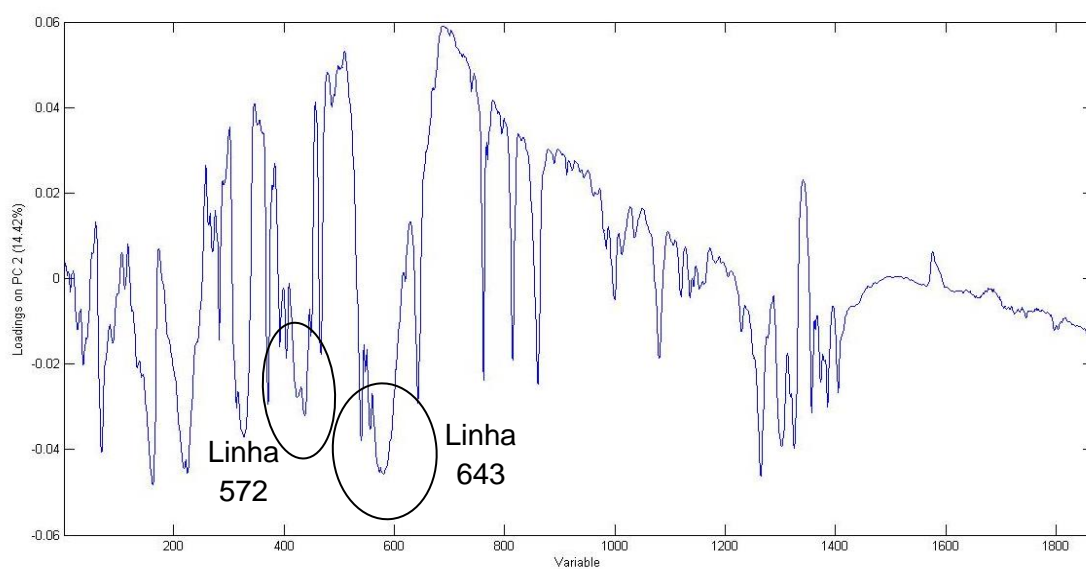


FIGURA 37 - GRÁFICO DE LOADINGS PARA COMPONENTE PRINCIPAL DOIS (PC2) QUE REPRESENTA AS BANDAS SIGNIFICATIVAS PARA O ATRAENTE FLORAL *p*-DMB

5.2.3. Difração de raios-X (DRX)

A avaliação por difração de raios-X do *p*-DMB mostrou que o mesmo possui características de estrutura cristalina, como mostrado pela presença de picos estreitos indicativos de cristalinidade, por toda faixa de 2θ analisada (FIGURA 38). Quando o atraente floral foi solubilizado e o solvente orgânico evaporado, o composto ressolubilizado (*p*-DMBR) ainda manteve sua estrutura cristalina, embora com aspecto do difratograma diferente, o que mostra a possível presença de polimorfismo molecular do *p*-DMB, ou seja quando existe mais de uma forma cristalina (FIGURA 38).

A avaliação das micropartículas contendo o atraente floral (MP9%, MP19% e MP40%), quando comparada com a do polímero puro e da formulação sem *p*-DMB (MP0%), mostrou perfil semelhantes, sendo que não foram observados picos de cristalinidade do atraente floral *p*-DMB. A estrutura semicristalina do polímero PHBV foi mantida quando na forma de micropartículas. Foi observado picos estreitos indicativos de cristalinidade do polímero como também a presença de um halo amorfo em $2\theta = 23^\circ$, em todas as amostras avaliadas (FIGURA 39).

Embora não tenha sido observado nenhum pico de cristalinidade do atraente floral nos difratogramas obtidos para as micropartículas contendo o *p*-DMB, não pode ainda ser descartada a presença do composto cristalino, incorporado no interior das micropartículas. Esta constatação será confirmada pela análise térmica do *p*-DMB ressolubilizado, por meio da calorimetria exploratória diferencial. A presença de um pico de fusão na curva de DSC para o composto puro ressolubilizado será um indicativo da presença da forma cristalina encapsulada. Além disso, significa que a partícula está bem formada e que não há cristais do composto na superfície.

De acordo com a literatura, a forma como o princípio ativo está presente no interior das micropartículas é um parâmetro importante a ser considerado na cinética de liberação do composto (SILVA-JUNIOR *et al.*, 2009). Sólidos no estado amorfo, em geral, são mais solúveis que sua forma cristalina, devido à energia livre envolvida no processo de dissolução. Neste estado, as moléculas do sólido formam um arranjo aleatório sem organização e uma baixa energia é necessária para separá-las,

portanto, sua liberação se torna mais rápida (RIEKES *et al.*, 2011).

Sabe-se que uma maior liberação acontece quando a diminuição da cristalinidade é observada para o polímero utilizado no processo de encapsulação aliado a um estado menos cristalino do agente encapsulado. Isto porque oferece menor resistência à difusão (GRILLO *et al.*, 2011).

O polímero PHBV pode vir a dificultar a taxa de liberação do *p*-DMB, devido à cristalinidade observada, pelo difratograma avaliado. O estado cristalino do atraente floral pode vir a ser outro fator determinante na rapidez com que a sua liberação ocorre.

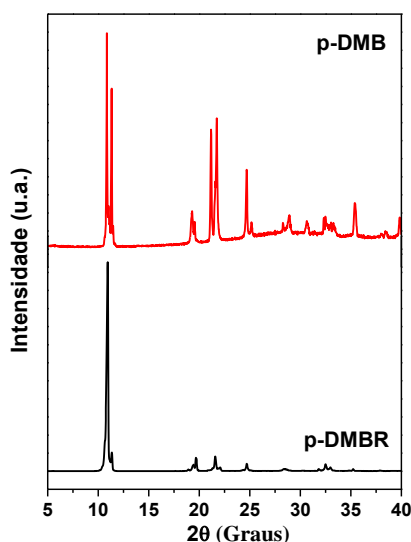


FIGURA 38 – DIFRATOGRAMAS OBTIDOS PARA AS AMOSTRAS DE ATRAENTE FLORAL *p*-DMB E *p*-DMBR (ANTES E APÓS PROCESSO DE SOLUBILIZAÇÃO (RESSOLUBILIZADO), RESPECTIVAMENTE)

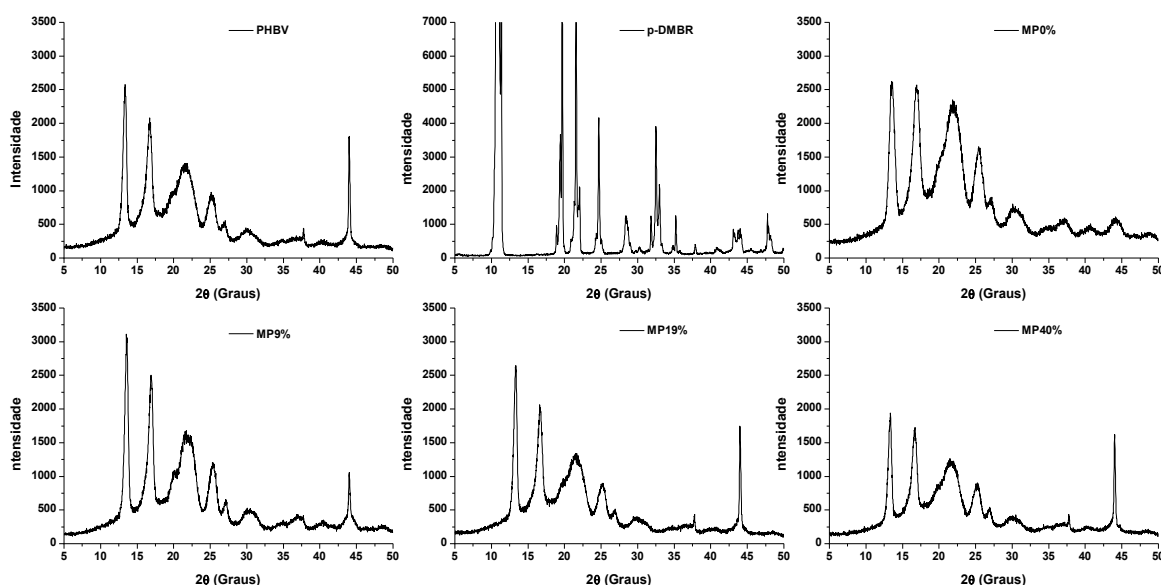


FIGURA 39 – DIFRATOGRAMAS OBTIDOS PARA AS AMOSTRAS DE PHBV PURO, ATRAENTE FLORAL *p*-DMBR (APÓS SOLUBILIZAÇÃO), MICROPARTÍCULAS SEM ATRAENTE FLORAL (MP0%) E MICROPARTÍCULAS CONTENDO *p*-DMB (MP9%; MP19% E MP40%)

A avaliação dos difratogramas obtidos para as misturas físicas mostrou que estas amostras apresentaram o mesmo perfil observado para as de micropartículas formuladas sem e com o atraente floral *p*-DMB (FIGURA 40).

Apesar de não ter sido observado picos estreitos indicativos de cristalinidade, que representa a presença de *p*-DMB, a comparação entre dois difratogramas: da mistura física contendo 9% do atraente floral (MF9% m/m) e do mesmo ressolubilizado (*p*-DMBR), com as escalas aumentadas mostrou dois picos cristalinos em 19 e 21° (FIGURA 41).

Portanto, não se pode descartar a possibilidade da presença do atraente floral *p*-DMB, em seu estado cristalino, na composição das micropartículas de PHBV. SILVA-JUNIOR *et al.*, (2009) fizeram a mesma observação quando avaliaram os difratogramas tanto para as micropartículas de poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA) como para as misturas físicas entre o polímero em questão e o fármaco triancinolona (anti-inflamatório), este cristalino.

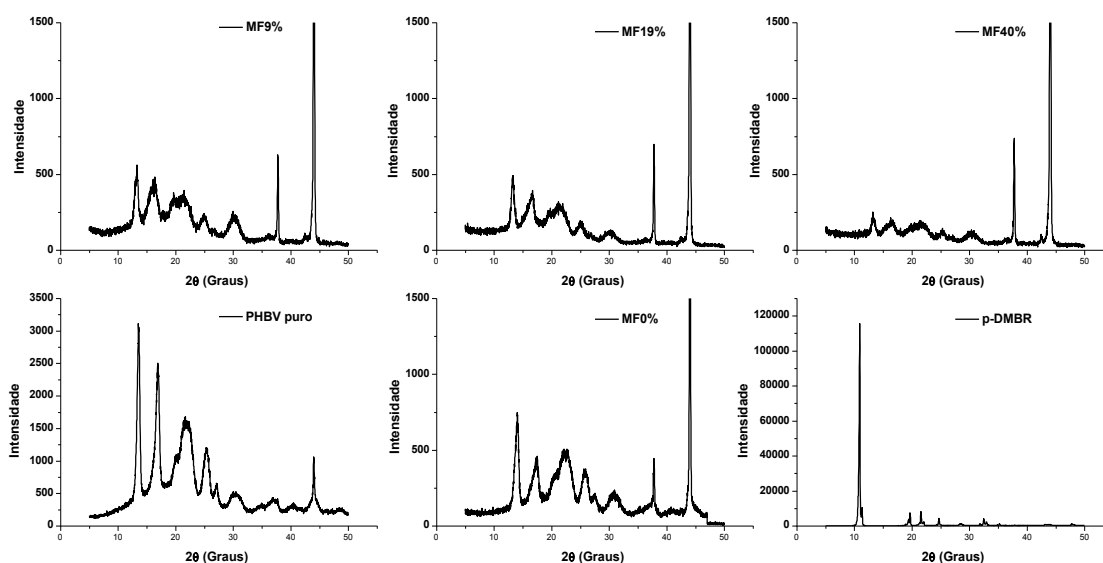


FIGURA 40 – DIFRATOGRAMAS OBTIDOS PARA AS AMOSTRAS DE PHBV PURO, ATRAENTE FLORAL *p*-DMB (APÓS SOLUBILIZAÇÃO), MISTURA FÍSICA SEM ATRAENTE FLORAL (MF0%) E MISTURAS FÍSICAS CONTENDO *p*-DMB (MF9%; MF19% E MF40%)

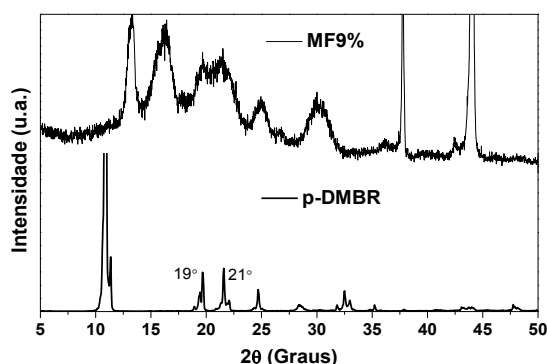


FIGURA 41 – DIFRATOGRAMAS OBTIDOS PARA AS AMOSTRAS DE ATRAENTE FLORAL *p*-DMBR (APÓS PROCESSO DE SOLUBILIZAÇÃO) E MISTURA FÍSICA (FILME) CONTENDO 9%(m/m) DE *p*-DMB (MF9%)

5.2.4. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Mediante a inspeção das curvas de calorimetria exploratória diferencial para as micropartículas de PHBV sem *p*-DMB e contendo o mesmo, misturas físicas PHBV/atraente floral, PHBV puro e *p*-DMB antes e após ressolubilização foi possível

obter os valores correspondentes de temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura de cristalização (T_c) e temperatura de fusão cristalina (T_m) assim como a variação de entalpia de fusão (ΔH_m) e de cristalização (ΔH_c), para as amostras avaliadas (TABELA 9). Todas as curvas apresentaram o mesmo perfil mostrado para a obtida para o polímero puro (FIGURA 42).

É possível dizer que, pelos valores obtidos de T_g e T_m , os processos de encapsulação por emulsão/evaporação do solvente e o de formação de filmes (casting) são responsáveis por alterar as propriedades térmicas do polímero PHBV puro.

Os valores determinados para as porcentagens de cristalinidade (%C), obtidos para as micropartículas MP9%, MP19% e MP40% revelaram uma diminuição no teor de cristalinidade, quando comparado com o valor determinado para a composição MP0% (TABELA 9). Esta tendência pode ser perfeitamente explicada pela presença do atraente floral *p*-DMB disperso no interior das formulações avaliadas. Já para as misturas físicas contendo o *p*-DMB, ocorreu um aumento para as amostras MF9% e MF40%, indicativo da presença do atraente floral em sua forma cristalina. Isto só é possível devido ao fenômeno de polimorfismo molecular existente para alguns sólidos cristalinos assim como pela forma de preparação das amostras.

TABELA 9 – VALORES OBTIDOS A PARTIR DAS CURVAS DE DSC PARA TEMPERATURA DE FUSÃO CRISTALINA (T_m), VARIAÇÃO DE ENTALPIA DE FUSÃO (ΔH_m), TEMPERATURA DE CRISTALIZAÇÃO (T_c), VARIAÇÃO DE ENTALPIA DE CRISTALIZAÇÃO (ΔH_c), TEMPERATURA DE TRANSIÇÃO VÍTEA (T_g) E PORCENTAGEM DE CRISTALINIDADE (%C) PARA AMOSTRAS DE MICROPARTÍCULAS E MISTURAS FÍSICAS

| Amostras | T_m (°C) | ΔH_m (J.g ⁻¹) | T_c (°C) | ΔH_c (J.g ⁻¹) | T_g (°C) | %C |
|----------------|------------|-----------------------------------|------------|-----------------------------------|------------|-------|
| PHBV | 162 | 30 | 77 | 46 | -1,7 | 21 |
| <i>p</i> -DMB | 55 | ----- | 30 | ----- | ----- | ----- |
| <i>p</i> -DMBR | 54 | ----- | 26 | ----- | ----- | ----- |
| MP(0%) | 158 | 37 | 75 | 45 | -3,0 | 25 |
| MP(9%) | 159 | 29 | 73 | 30 | -1,6 | 20 |
| MP(19%) | 160 | 36 | 70 | 40 | -0,9 | 25 |
| MP(40%) | 161 | 27 | 65 | 29 | -1,7 | 18 |
| MF(0%) | 157 | 35 | 64 | 38 | -2,9 | 24 |
| MF(9%) | 159 | 37 | 57 | 39 | -2,3 | 26 |
| MF(19%) | 159 | 33 | 68 | 41 | -1,9 | 23 |
| MF(40%) | 160 | 35 | 67 | 44 | -2,2 | 24 |

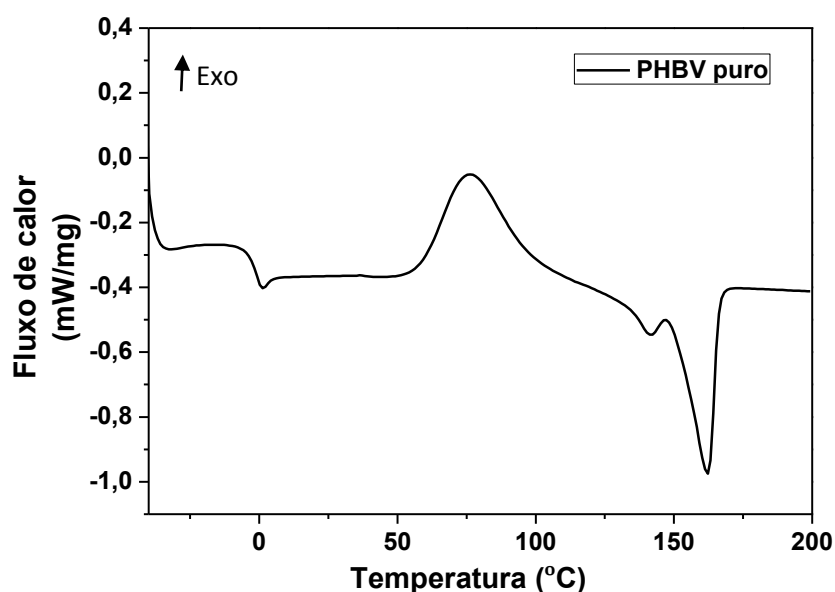


FIGURA 42 – CURVA DE DSC DO PHBV PURO EM ATMOSFERA INERTE DE N₂, TAXA DE AQUECIMENTO E RESFRIAMENTO DE 10°C.min⁻¹

Pela avaliação das temperaturas de transição vítrea (T_g) e temperatura de fusão cristalina (T_m) para todas as amostras de micropartículas contendo o *p*-DMB e misturas físicas PHBV/ atraente floral analisadas, foi observado um aumento nos valores de T_g e T_m quando comparado com as micropartículas e mistura física sem *p*-DMB, indicativo de que é necessária uma fração de energia maior para mover as cadeias poliméricas amorfas umas sobre as outras e fundir as porções cristalinas, respectivamente. Esta observação nos permite dizer que o atraente floral *p*-DMB está disperso na matriz polimérica (SILVA-JUNIOR *et al.*, 2009).

Foi observado um decréscimo na temperatura de cristalização (T_c) durante a segunda rampa de aquecimento (TABELA 9) das formulações de micropartículas contendo *p*-DMB em concentrações crescentes (MP9%, MP19% e MP40%). Esta alteração nos valores obtidos para T_c , quando comparado com o grupo controle (MP0%) deve-se ao aumento nos sítios cristalinos devido à presença de uma fração cristalina do atraente floral. Portanto é necessária uma temperatura menor para promover a formação dos mesmos sítios cristalinos pois ocorre uma interação favorável do *p*-DMB cristalino com a porção cristalina do polímero PHBV (CANEVAROLO JR, 2004).

O mesmo foi observado para a mistura física contendo *p*-DMB MF9% quando comparada com a MF0% (sem atraente floral/controle). Para as demais misturas físicas denominadas de MF19% e MF40%, ocorreu um aumento na temperatura de cristalização destas amostras quando comparadas com o controle. Esta observação pode ser um indicativo de que o atraente floral está presente dificultando o processo de cristalização do polímero.

De acordo com a literatura é possível obter um evento de cristalização durante o aquecimento, caso um polímero em seu estado fundido é resfriado de tal forma que não haja tempo suficiente para que o processo completo de cristalização ocorra. Durante a etapa de resfriamento, ocorre grande formação de núcleos cristalinos na amostra, porém o crescimento dos cristais não é significativo, especialmente se esta etapa atingir uma temperatura abaixo da T_g do polímero puro. Portanto, durante a rampa de aquecimento ocorre uma recristalização rápida, à uma temperatura inferior à de fusão do polímero como observado para o PHBV (CANEVAROLO JR., 2004).

As curvas de DSC tanto para as micropartículas e misturas físicas contendo o *p*-DMB (curvas não mostradas), não apresentaram pico de fusão característico do atraente floral. A ausência deste evento, referente ao composto cristalino, sugere

que o mesmo assume uma dispersão sólida no polímero durante o processo de evaporação do solvente, no qual o composto será encontrado dissolvido na matriz polimérica. Isto o torna parcialmente líquido durante os ciclos de aquecimento (LACERDA *et al.*, 2014; BRAGAGNI *et al.*, 2013).

Como já relatado, é possível sugerir que devido ao polimorfismo molecular, o *p*-DMB pode existir em mais de uma forma cristalina ou até mesmo em uma forma amorfa. Sabe-se que um composto polimórfico **A** pode ser transformado em um composto polimórfico **B** pelo efeito do solvente (SILVA-JUNIOR *et al.*, 2009).

De acordo com a literatura, alguns compostos possuem a habilidade de apresentar-se de várias formas no estado sólido, diferindo, desta forma, com relação às dimensões da cela unitária, arranjo atômico e interações intermoleculares, dando origem às estruturas tridimensionais diferentes. Estruturas tridimensionais diferentes para um mesmo composto gera propriedades físico-químicas diferenciadas tais como ponto de fusão, dissolução, morfologia entre outras (MATTEI e LIU, 2011).

O processo de solubilização do atraente floral *p*-DMB também alterou ligeiramente as características físicas do composto, evidenciado pelos valores obtidos de T_m e T_c para o composto *p*-DMBR (TABELA 9). Mas ficou claro que o atraente floral não perdeu sua característica cristalina já que foi observado pico de fusão para o *p*-DMBR (FIGURA 43) (LACERDA *et al.*, 2014). Estas observações estão de acordo com os dados obtidos por difração de raios-X para o composto ressolubilizado.

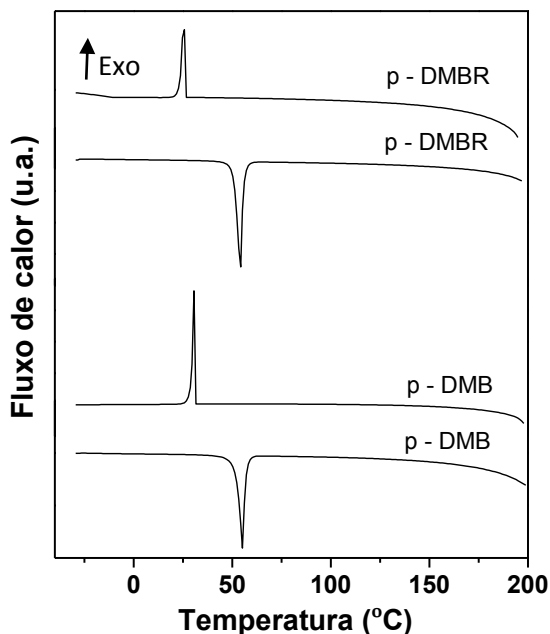


FIGURA 43 – CURVAS DE AQUECIMENTO E RESFRIAMENTO DO *p*-DMB PURO E DO ATRAENTE FLORAL RESSOLUBILIZADO (*p*-DMBR)

5.2.5. Análise termogravimétrica (TGA)

As curvas de análise termogravimétrica (FIGURA 44) foram obtidas para avaliação da estabilidade térmica das amostras devido às possíveis interações polímero/atraente floral. As micropartículas contendo *p*-DMB, MP(9%*m/m*), MP(19%*m/m*) e MP(40%*m/m*), apresentaram estabilidade térmica à uma temperatura inferior (282; 282 e 284°C, respectivamente) do que as micropartículas de PHBV sem o atraente floral (grupo controle) (288°C) e ao PHBV puro (286°C) (TABELA 10).

TABELA 10 – DADOS OBTIDOS PELAS CURVAS DE TGA E PELA PRIMEIRA DERIVADA DAS CURVAS (dTGA)

| Amostras | T _i (°C)* | T _{máx} (°C)* | T _f (°C)* | Δ _m (%)** |
|---------------|----------------------|------------------------|----------------------|----------------------|
| <i>p</i> -DMB | 95 | 160 | 180 | 100 |
| PHBV | 259 | 286 | 310 | 100 |
| MP(0%) | 257 | 288 | 314 | 100 |
| MP(9%) | 248 | 282 | 301 | 100 |
| MP(19%) | 251 | 282 | 312 | 100 |
| MP(40%) | 259 | 284 | 312 | 100 |

NOTA: (*) T_i, T_{MÁX} E T_f FORAM OBTIDAS PELA DERIVADA DAS CURVAS DE TGA.

(**) Δ_M (%) FOI OBTIDA PELA INTEGRAÇÃO DOS PICOS OBTIDOS PELA DERIVADA.

As curvas termogravimétricas do PHBV puro e das micropartículas de PHBV sem o *p*-DMB (grupo controle) (FIGURA 44) apresentaram estabilidades térmicas semelhantes (diferença de 2°C), sugerindo que o processo de solubilização do PHBV e de preparação das micropartículas não interferiu na resistência térmica do polímero.

O polímero puro assim como a formulação sem *p*-DMB (MP0%) perdeu massa em uma única etapa. Esta perda de massa está associada com um evento exotérmico (degradação térmica da matriz polimérica) entre 259 e 310 °C e 257 e 314°C, respectivamente.

As micropartículas carregadas com o *p*-DMB assim como o atraente floral puro perderam massa em uma única etapa (FIGURA 44 e 45). Estas perdas de massas estão associadas com eventos exotérmicos entre 248 e 312°C e 95 e 180°C, relacionados com a degradação térmica do polímero e processos de volatilização do *p*-DMB, respectivamente (FIGURA 45).

Portanto, ficou evidente, pela avaliação das curvas de TGA, que o *p*-DMB não exerceu influência significativa na estabilidade térmica do PHBV, quando na forma de micropartículas.

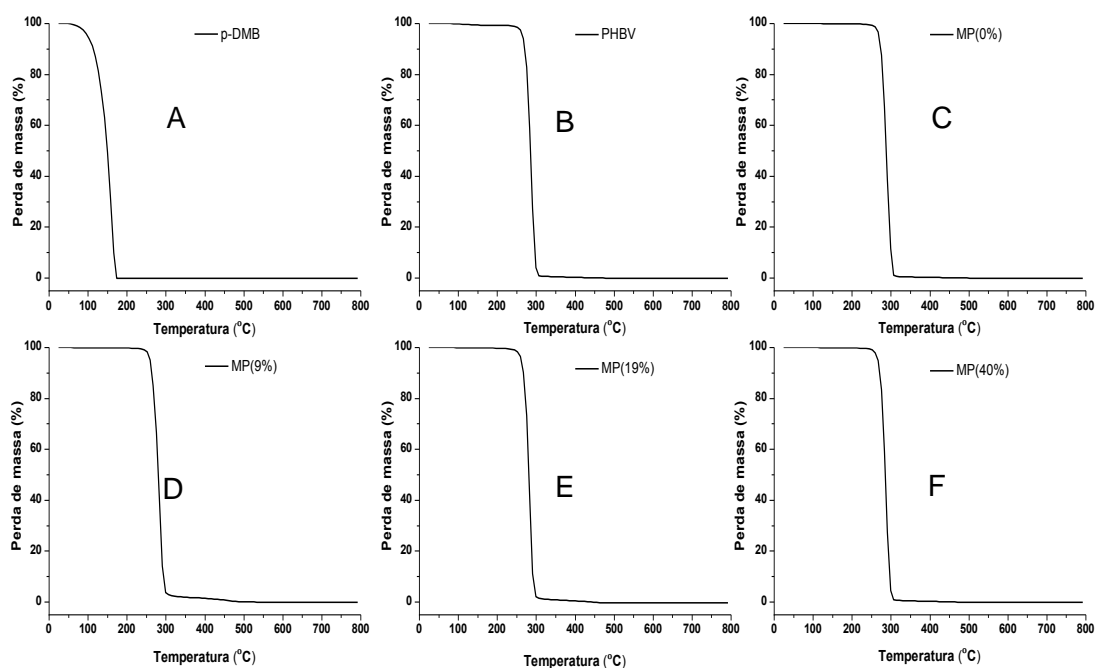


FIGURA 44 – CURVAS OBTIDAS POR ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA) DAS AMOSTRAS: A) *p*-DMB PURO; B) PHBV PURO; C) MICROPARTÍCULAS SEM ATRAENTE FLORAL (MP0%); D) MICROPARTÍCULAS CONTENDO 9%(m/m) DE *p*-DMB (MP9%); E) MICROPARTÍCULAS CONTENDO 19%(m/m) DE *p*-DMB (MP19%) E F) MICROPARTÍCULAS CONTENDO 40%(m/m) DE *p*-DMB (MP40%)

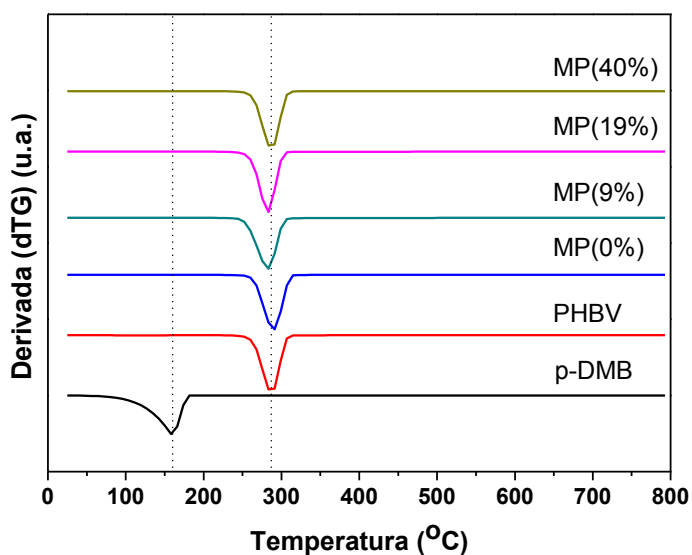


FIGURA 45 – DERIVADAS DAS CURVAS DE TGA DO ATRAENTE FLORAL (*p*-DMB), DO POLÍMERO PURO (PHBV) E DAS MICROPARTÍCULAS SEM ATRAENTE (MP0%) E DAS CONTENDO O *p*-DMB (MP9%, MP19% E MP40%) (dTG)

As estabilidades térmicas das micropartículas contendo o *p*-DMB comparadas com o grupo controle (MP0%) e com o PHBV puro foram reduzidas, indicativo da presença do atraente floral encapsulado. Estes dados estão em concordância com Riekes e colaboradores (2011) que observaram que a presença do ativo possivelmente promove mudanças nas características do material polimérico como a alteração das temperaturas nas quais o processo de degradação se inicia.

Para efeito de comparação com as micropartículas formuladas, misturas físicas (filmes) do polímero PHBV sem atraente floral (MF0%) e contendo o *p*-DMB em proporções baseadas nas formulações de micropartículas preparadas foram avaliadas.

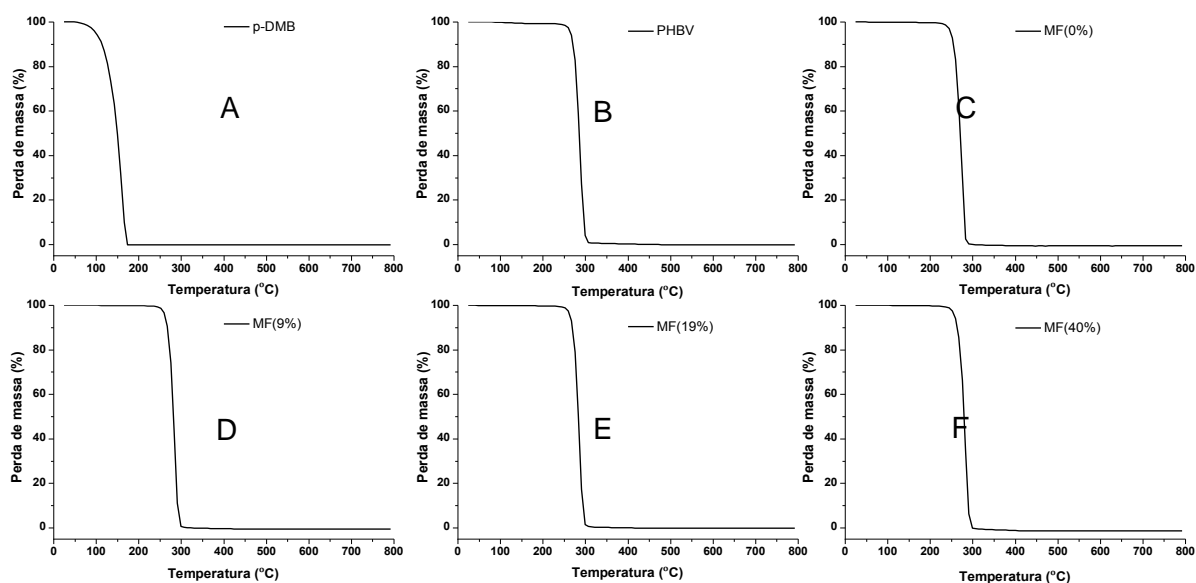
As curvas de TGA do PHBV puro e da mistura física (filme) de PHBV sem o atraente floral (FIGURA 44) apresentaram estabilidades térmicas bem próximas assim como observado para as micropartículas poliméricas sem *p*-DMB, o que sugere que o processo de solubilização do polímero altera a resistência térmica do PHBV puro.

Assim como o polímero e o atraente floral puros, as misturas físicas sem *p*-DMB (MF0%) (controle) e as contendo o *p*-DMB perderam massa em uma única etapa (FIGURA 46 e 47). Estas perdas de massas para MF0% e para MF9, 19 e 40% estão associadas a eventos exotérmicos (degradação térmica do polímero) entre 232 e 292°C e 243 e 309°C, respectivamente (TABELA 11).

A estabilidade térmica para todas as amostras contendo o atraente floral foi aumentada (283°C) com relação à mistura física controle (275°C) (TABELA 11). Estes resultados sugerem que o *p*-DMB não alterou significativamente a estabilidade térmica do polímero independente da forma como as misturas foram feitas (mistura física/filme ou micropartícula).

TABELA 11 – DADOS OBTIDOS PELAS CURVAS DE TGA E PELA PRIMEIRA DERIVADA DAS CURVAS (dTGA)

| Amostras | T _i (°C)* | T _{máx} (°C)* | T _f (°C)* | Δ _m (%)** |
|---------------|----------------------|------------------------|----------------------|----------------------|
| <i>p</i> -DMB | 95 | 160 | 180 | 100 |
| PHBV | 259 | 286 | 310 | 100 |
| MF(0%) | 232 | 275 | 292 | 100 |
| MF(9%) | 247 | 283 | 307 | 100 |
| MF(19%) | 249 | 283 | 309 | 100 |
| MF(40%) | 243 | 283 | 309 | 100 |

NOTA: (*) T_i, T_{MÁX} E T_f FORAM OBTIDAS PELA DERIVADA DAS CURVAS DE TGA(**) Δ_M (%) FOI OBTIDA PELA INTEGRAÇÃO DOS PICOS OBTIDOS PELA DERIVADAFIGURA 46 – CURVAS DE TGA OBTIDAS POR ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA DAS AMOSTRAS: A) *p*-DMB PURO; B) PHBV PURO; C) MISTURA FÍSICA PHBV SEM ATRAENTE FLORAL (MF0%); D) MISTURA FÍSICA CONTENDO 9%(m/m) DE *p*-DMB (MF9%); E) MISTURA FÍSICA CONTENDO 19%(m/m) DE *p*-DMB (MF19%) E F) MISTURA FÍSICA CONTENDO 40%(m/m) DE *p*-DMB (MF40%)

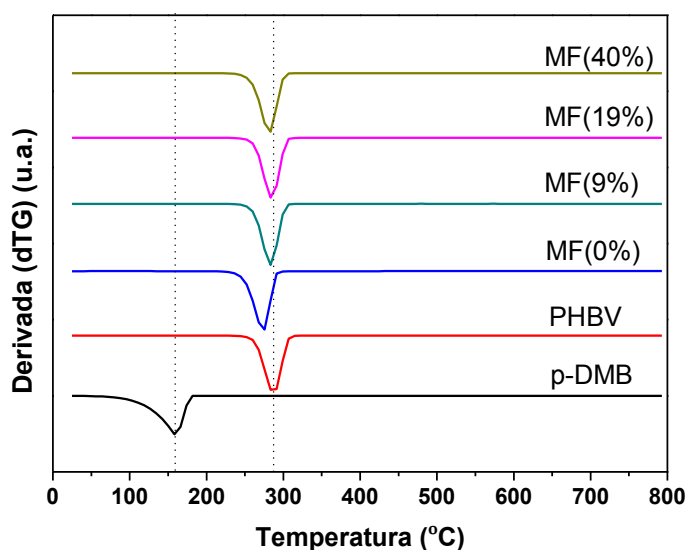


FIGURA 47 – DERIVADAS DAS CURVAS DE TGA DO ATRAENTE FLORAL (p-DMB), DO POLÍMERO PURO (PHBV) E DAS MISTURAS FÍSICAS SEM ATRAENTE (MF0%) E DAS CONTENDO O MESMO (MF9%, MF19% E MF40%) (dTG)

5.2.6. Análise de área superficial e diâmetro de poros por meio do método BET

Por meio das isotermas avaliadas pelo método BET (Brunauer-Emmett-Teller) foi possível determinar valores de área superficial, de diâmetro médio e de volume de poros, a 77 °C para as micropartículas de PHBV (TABELA 12).

Esta técnica, que emprega, como princípio, a adsorção e dessorção de nitrogênio gasoso sobre uma superfície sólida, à uma determinada temperatura, é utilizada na determinação da área superficial específica e diâmetro de poros de amostras porosas e finamente divididas (TIBONE, 2007), como as aqui apresentadas.

De acordo com a literatura, o método BET ou Teoria de Adsorção Multimolecular é uma extensão da teoria de Langmuir. Enquanto esta teoria elucida que uma única camada de gás é adsorvida em uma superfície sólida, o método de BET elucida multicamadas de gás adsorvidas na superfície de uma amostra.

As áreas superficiais (TABELA 12), determinadas para as formulações MP (9%) e MP (19%) foram menores às apresentadas pelas amostras MP (0%) e MP (40%). A redução dos valores de área superficial, comparando-se com a formulação

sem o *p*-DMB (MP0%) pode ser atribuída à presença do atraente floral, recobrendo os volumes de poros presentes na superfície das formulações (BECK *et al.*, 2008; DOMIGUES *et al.*, 2008; PEREIRA *et al.*, 2006).

O valor superior encontrado para a amostra, contendo 40% (m/m) de atraente floral com relação à massa de polímero (MP40%), pode ser explicado pelo fato do *p*-DMB estar mais concentrado no interior das micropartículas de PHBV do que na superfície.

Além desta evidência, esta diminuição observada na área superficial pode estar relacionada com um aumento no tamanho das micropartículas das amostras avaliadas (BECK *et al.*, 2008; DOMINGUES *et al.*, 2008). Esta hipótese só será comprovada por meio da análise granulométrica das formulações estudadas.

TABELA 12 - VALORES DE ÁREA SUPERFICIAL E DIÂMETRO DE PORO MÉDIO PARA AS FORMULAÇÕES DE MICROPARTÍCULAS DE PHBV (VALORES OBTIDOS A 77 °C)

| Amostras | Área superficial (m ² .g ⁻¹)* | | Diâmetro médio de poros (nm)* | | Volume de poros (cc.g ⁻¹)* | |
|----------|--|----------------|-------------------------------|----------------|--|----------------|
| | 1 ^a | 2 ^a | 1 ^a | 2 ^a | 1 ^a | 2 ^a |
| MP (0%) | 2,73 | 4,14 | 6,59 | 4,79 | 0,0045 | 0,005 |
| MP (9%) | 0,05 | ----- | 120 | ----- | 0,00015 | ----- |
| MP (19%) | 0,75 | 1,66 | 10 | 1,48 | 0,00019 | 0,0006 |
| MP (40%) | 3,97 | 0,76 | 43 | 1,60 | 0,0043 | 0,0003 |

*DUPLICATA

De acordo com a IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) há seis tipos de isotermas de adsorção (FIGURA 48). Como mostra a FIGURA 48, a isoterma do tipo I é característica de materiais microporosos. A do tipo II e IV é relativa a materiais não-porosos e mesoporosos (poros razoavelmente grandes), respectivamente. Já as isotermas do tipo III e V não são interessantes para avaliação da estrutura porosa porque o substrato é considerado fraco, ou seja, as moléculas do gás (adsorvato) possui maior afinidade entre si do que com o próprio adsorvente. A do tipo VI, chamada de isoterma em camadas, não é muito comum

entre os materiais pois representa um sólido não-poroso com superfície praticamente uniforme (IUPAC).

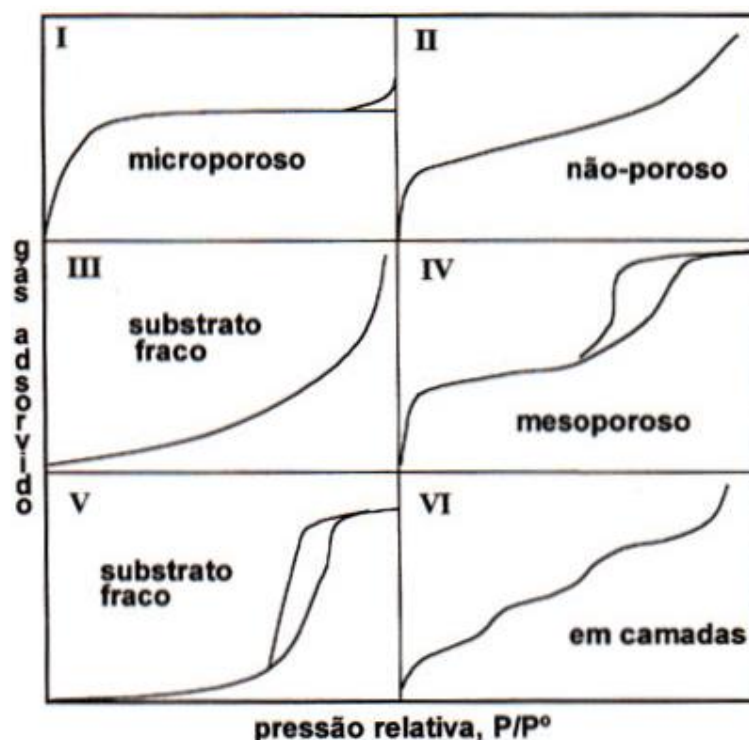


FIGURA 48 - TIPOS DE ISOTERMAS DE ADSORÇÃO OBTIDAS PELO MÉTODO BET (FONTE: IUPAC)

As isothermas de adsorção mostradas (FIGURA 49A, 49B, 49C e 49D) representam o volume de nitrogênio gasoso adsorvido por grama de micropartículas com relação à pressão relativa do gás.

As isothermas obtidas para a amostra de micropartículas de PHBV sem atraente floral (MP0%) (FIGURA 49A), tanto na primeira como na segunda análise apresentaram volumes de gás adsorvido versus a pressão relativa similares, sendo desta forma, um indicativo de homogeneidade da amostra em termos de tamanho de partícula, diâmetro e volume de poros.

A avaliação das isothermas de adsorção para a amostra de micropartículas contendo *p*-DMB, denominada de MP19%, mostraram semelhança com relação ao volume de nitrogênio gasoso adsorvido para ambas análises. O diferencial foi na

pressão relativa em que o gás foi adsorvido, ou seja, para adsorver a mesma quantidade de gás, a pressão relativa apresentou-se maior na segunda análise. Isto sugere ligeira heterogeneidade da amostra com relação à tamanho, diâmetro e volume de poros. A mesma heterogeneidade é observada para a amostra de micropartícula denominada MP40%, em ambas as análises.

De acordo com a IUPAC, comparando as isotermas definidas na literatura com as obtidas para as formulações de micropartículas de PHBV avaliadas, a isoterma de adsorção das amostras estudadas não apresentam perfil condizente com os modelos mostrados. A avaliação para a amostra MP0%, com base no valor determinado de diâmetro médio de poros (6,59 nm), a coloca como um material mesoporoso, ou seja, com poros razoavelmente grandes (TABELA 12).

Com base no valor de diâmetro médio de poros (120nm) a amostra MP9% é macroporosa, enquanto que MP19% e MP40% apresentaram diâmetros médios de poros de 10 e 43nm, respectivamente, sendo classificadas como mesoporosas, de acordo com a IUPAC.

Sabe-se que segundo a IUPAC, diâmetro de poros maiores que 50nm são chamados de macroporos, menores que 2nm, microporos e os intermediários entre ambos ($2 \text{ nm} < \text{diâmetro dos poros} < 50 \text{ nm}$) são os mesoporos. Os poros medidos neste experimento, podem ser visualizados por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

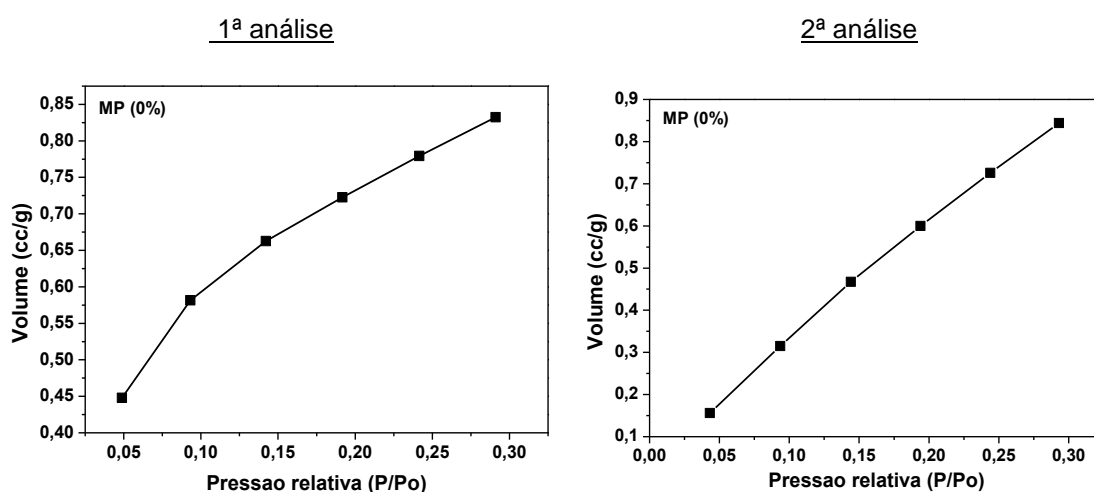


FIGURA 49A - ISOTERMAS DE ADSORÇÃO DE N₂ PARA AS MICROPARTÍCULAS DE PHBV (MP0%), AVALIAÇÃO EM DUPLICATA

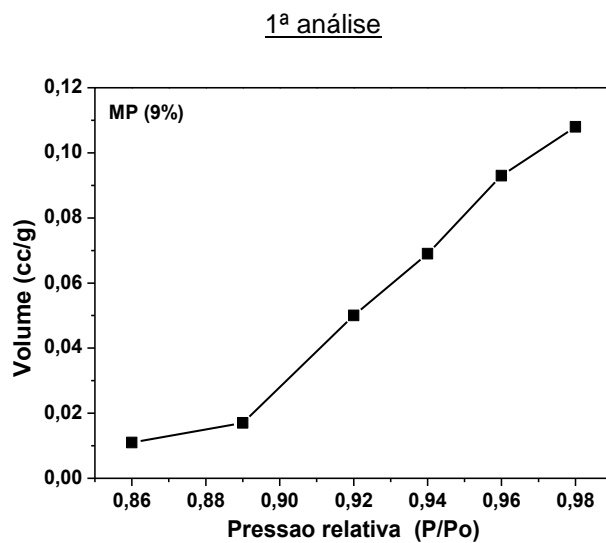


FIGURA 49B - ISOTERMA DE ADSORÇÃO DE N₂ PARA AS MICROPARTÍCULAS DE PHBV CONTENDO *p*-DMB (MP9% m/m)

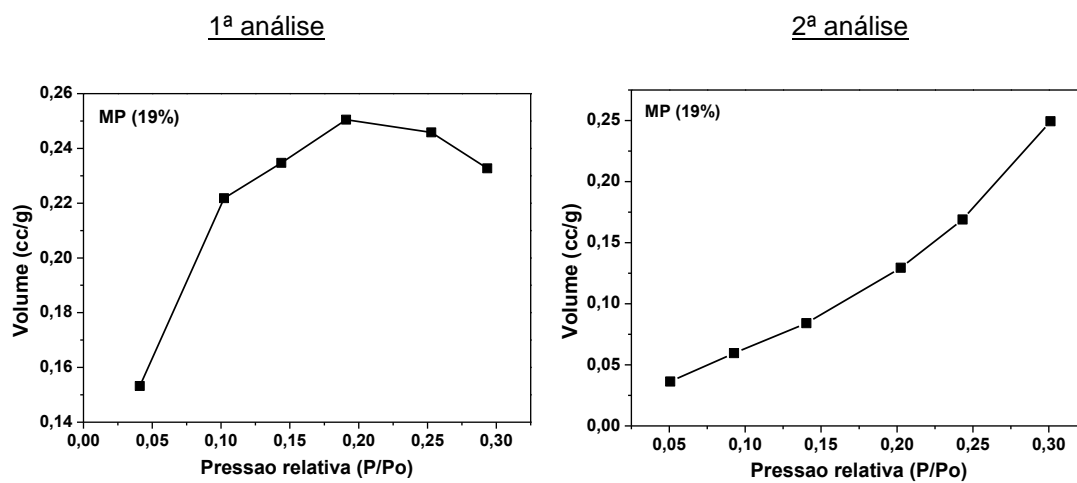


FIGURA 49C - ISOTERMAS DE ADSORÇÃO DE N₂ PARA AS MICROPARTÍCULAS DE PHBV CONTENDO *p*-DMB (MP19% m/m), AVALIAÇÃO EM DUPLICATA

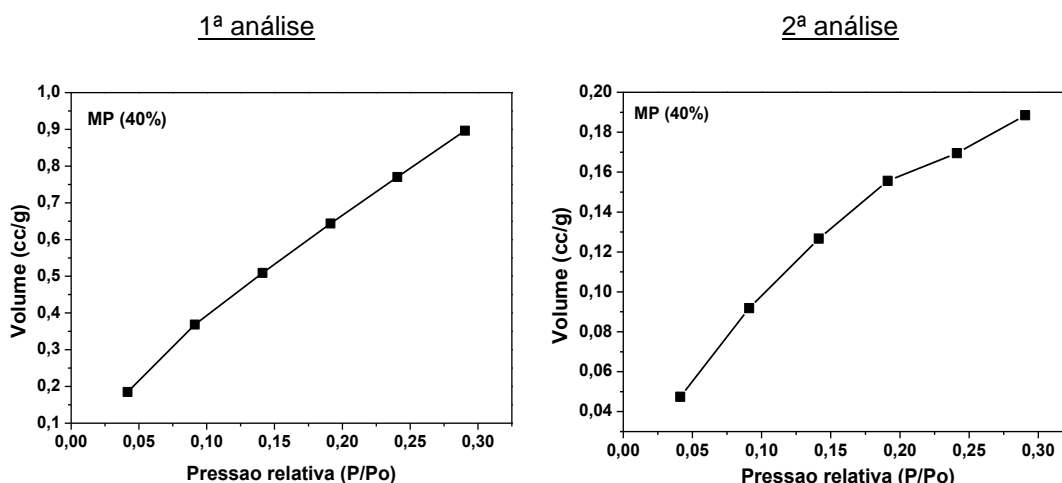


FIGURA 49D - ISOTERMAS DE ADSORÇÃO DE N₂ PARA AS MICROPARTÍCULAS DE PHBV CONTENDO *p*-DMB (MP40% m/m), AVALIAÇÃO EM DUPLICATA

As isothermas obtidas por meio do método BET estão relacionadas com a interação física (adsorção física ou de Van der Waals) entre o nitrogênio gasoso e a superfície das amostras (volume de gás por grama de amostra). Sabe-se que este fenômeno está intimamente ligado à natureza das formulações estudadas.

Estas isothermas de adsorção são de fundamental importância quando o objetivo é conhecer a área superficial específica (relação com tamanho de partícula) e a estrutura dos poros do material avaliado (TEIXEIRA *et al.*, 2001). Logo, os tipos de isothermas estão intimamente relacionados com os tamanhos e tipos de poros presentes nas formulações em questão (TEIXEIRA *et al.*, 2001).

As micropartículas de PHBV formuladas neste trabalho apresentam poros que são característicos de estruturas cristalinas, formando redes regulares (IUPAC), como evidenciado nas fotomicrografias das amostras estudadas. Portanto, provavelmente os poros evidenciados nas fotomicrografias e avaliados pelo método BET são inerentes à característica de cristalinidade dos compostos envolvidos (PHBV e *p*-DMB).

Portanto, as micropartículas de PHBV são ideais para realizar a encapsulação e ensaios de liberação do atraente floral *p*-DMB. A presença de poros por toda a superfície das partículas permitirá a liberação, por meio de processos de volatilização do éter aromático. A heterogeneidade das amostras avaliadas, assim como a pequena área superficial dos materiais estudados, terá grande influência na cinética de liberação das micropartículas. Pequena área superficial está intimamente

ligada a um maior tamanho de partícula, o que retardará a liberação (RITGER e PEPPAS, 1987).

5.2.7. Estudo morfológico e de superfície das micropartículas de PHBV por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As fotomicrografias das micropartículas de PHBV sem (grupo controle) e contendo o atraente floral obtidas por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV), são mostradas na FIGURA 50. Todas as amostras apresentaram-se esféricas, de tamanhos variados e com superfície porosa e rugosa, característica esta do polímero utilizado no preparo das formulações (SENHORINI *et al.*, 2012; FARAGO *et al.*, 2008; MARTIN *et al.*, 2000).

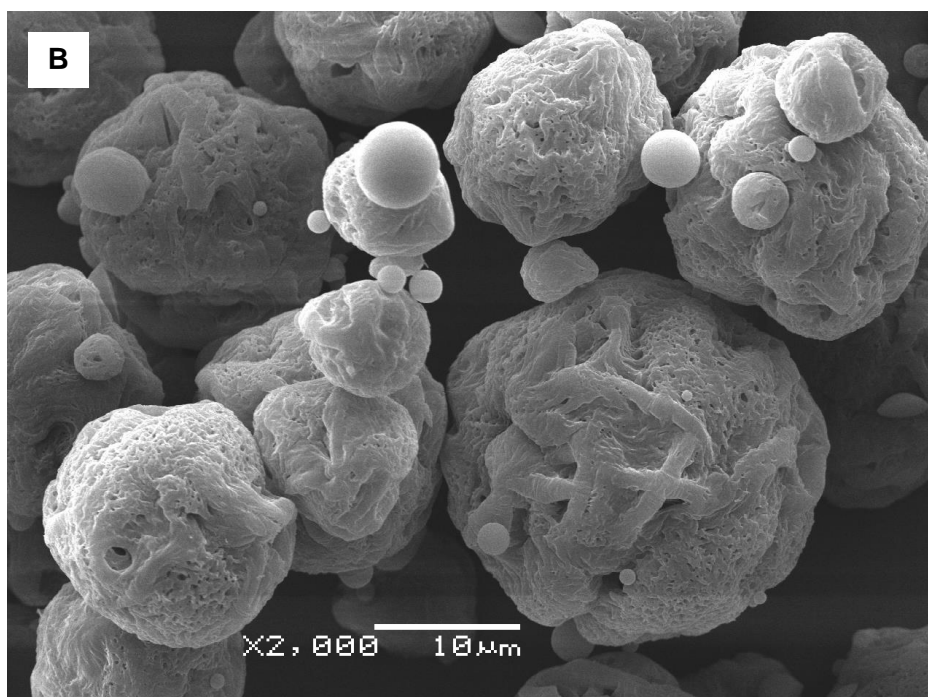
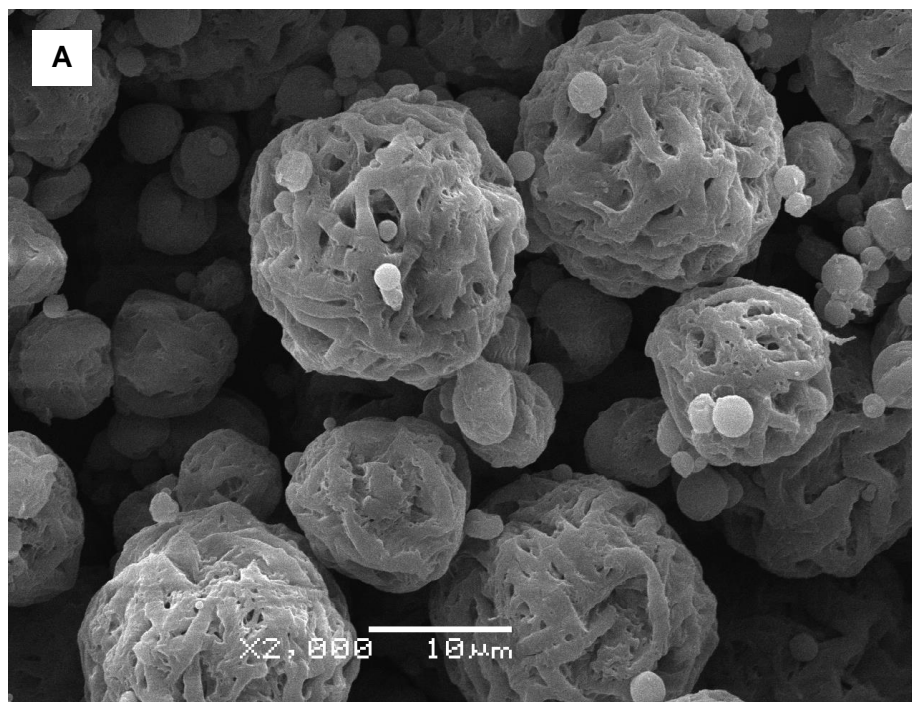
Sabe-se que a rugosidade observada nas micropartículas de PHBV, produzidas pelo método de evaporação do solvente, à temperatura ambiente sob pressão reduzida ou à pressão atmosférica, é simplesmente resultado da cristalinidade do polímero (MARTIN *et al.*, 2000).

Segundo a literatura, micropartículas de PHBV contendo, como princípio ativo, o fármaco carvedilol, sendo este um composto cristalino, apresentaram também uma grande quantidade de poros e superfície rugosa (RIEKES *et al.*, 2011), assim como observado para as amostras aqui avaliadas.

Comparando-se as fotomicrografias das partículas contendo o *p*-DMB (FIGURA 50B,C,D), é possível observar que a formulação (D) MP40% apresentou uma maior quantidade de poros em relação às amostras (B) MP9% e (C) MP19%. De acordo com a IUPAC materiais porosos podem ser formados por diferentes rotas. Neste caso, poros são características inerentes de compostos cristalinos (IUPAC) como é o caso do PHBV (semicristalino) e do *p*-DMB. Portanto quanto maior a concentração de atraente floral, maior é a quantidade de poros formados.

A análise de superfície das micropartículas de PHBV, por meio da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV), está de acordo com a avaliação realizada pelo método de BET. A presença de macroporos nas partículas, confirmadas pela análise de BET, foi observada também pelas fotomicrografias

obtidas. Esta constatação também foi evidenciada por Pereira e colaboradores (2006) em estudo de micropartículas contendo um fármaco lipofílico.



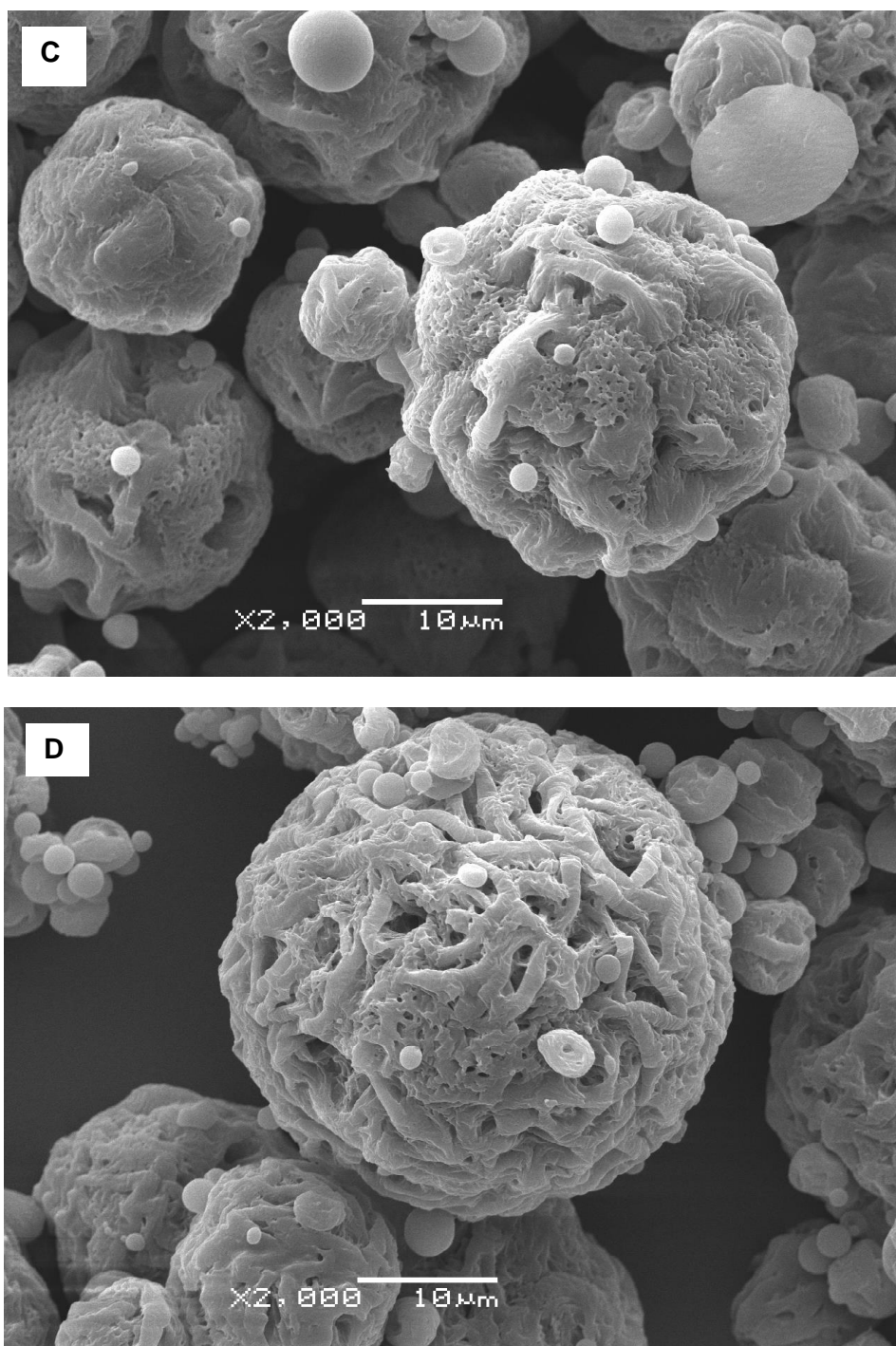


FIGURA 50 - FOTOMICROGRAFIAS OBTIDAS POR MEV DAS MICROPARTÍCULAS DE PHBV: (A) MP0%, (B) MP9%, (C) MP19% E (D) MP40%. AUMENTOS DE 2000X

5.2.8. Estudo morfológico e de superfície das misturas físicas PHBV/*p*-DMB por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As fotomicrografias dos filmes de PHBV puro (MF0%) (grupo controle) e dos filmes PHBV/*p*-DMB nas mesmas relações massa/massa polímero e atraente floral, utilizadas no preparo das micropartículas neste trabalho, obtidas por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV), são mostradas na FIGURA 51.

O filme de PHBV (MF0%) (FIGURA 51A) apresentou uma superfície rugosa com presença de poucos poros em sua extensão. O mesmo comportamento foi observado para filmes de PHBV utilizados em estudos de biodegradação (Weng *et al.*, 2011; Weng *et al.*, 2010). Os poros distribuídos pela superfície do filme obtido a partir do polímero puro são atribuídos à evaporação do solvente orgânico (clorofórmio). As bordas dos poros formados são consideradas uniformes sem falhas como já relatado na literatura (CARMINATTI, 2008).

A partir da avaliação das micropartículas de PHBV é possível dizer que o polímero em questão pode ser realmente aplicado na confecção de sistemas de liberação controlada de princípios ativos em geral. A estrutura porosa possibilita esta aplicação porque permite a difusão de compostos por meio de seus poros.

Os filmes contendo o atraente floral (MF9%, MF19% e MF40%) (FIGURA 51B, 51C e 51D) se mostraram heterogêneos microscopicamente, com a formação de duas fases bem distintas. Para os filmes de PHBV contendo 9%(m/m) e 19%(m/m) de *p*-DMB, a fase inferior cinza escuro, observada pelas fotomicrografias, é constituída pelo polímero PHBV e a fase superior cinza claro pode ser considerada uma rede porosa do atraente floral.

Além disso, é possível observar que conforme foi aumentada a concentração do atraente floral, a rede porosa do composto foi tornando-se desorganizada (FIGURA 51C) até permanecer na forma de grânulos, estes evidenciados na FIGURA 51D, filme de PHBV contendo 40%(m/m) de *p*-DMB em sua composição.

Portanto, a formação de duas fases pode ser explicada pela rapidez de evaporação do solvente orgânico clorofórmio. Conforme a evaporação ocorreu, o atraente floral foi se agregando, o que foi possível avaliar por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

É válido ressaltar que a estrutura rugosa e porosa do polímero PHBV puro foi mantida, como observado nas fotomicrografias contendo o atraente floral, e mais fortemente visualizada na FIGURA 51D. Para as demais não foi possível visualizar a estrutura rugosa e porosa do PHBV, o que fica mais evidente a separação de fases.

Logo, a partir das observações feitas pelas fotomicrografias das misturas físicas, é possível sugerir que a presença do atraente floral *p*-DMB disperso na matriz polimérica das micropartículas provoca uma cristalização diferente de acordo com a sua concentração, ora na forma de uma rede porosa e/ou de grânulos (separação de fases) (FIGURA 51B, 51C e 51D).

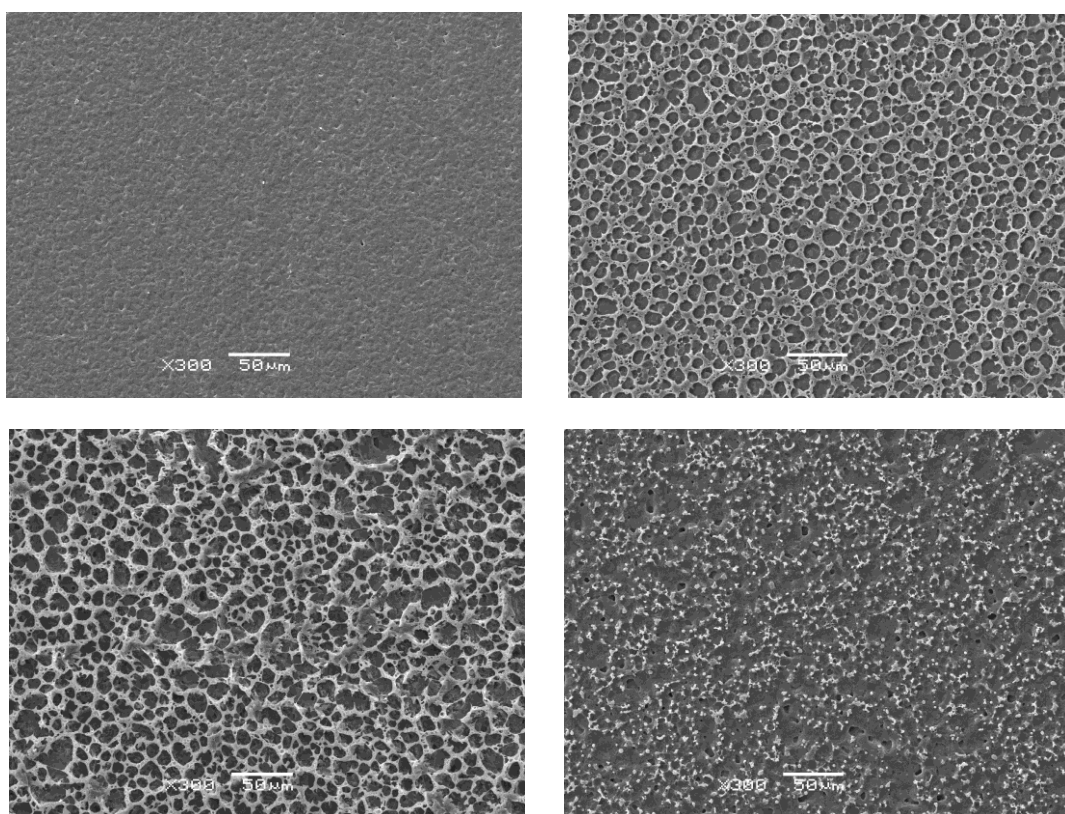


FIGURA 51 - FOTOMICROGRAFIAS OBTIDAS POR MEV DAS MISTURAS FÍSICAS PHBV/ATRATIVO FLORAL: (A) MF0%, (B) MF9%, (C) MF19% E (D) MF40%. AUMENTOS DE 300X

5.2.9. Análise de tamanho e partículas por meio de granulometria a laser

Os tamanhos de partículas foram obtidos a partir de suspensões aquosas das micropartículas de PHBV em concentração específica.

O grupo controle MP(0%) (TABELA 13) apresentou diâmetro médio de 16,65 μm e faixa de distribuição de tamanho de partículas na faixa de 0,5 a 63 μm .

As micropartículas contendo 9%, 19% e 40% (m/m) *p*-DMB (MP9, 19 e 40%), apresentaram diâmetro médio de 23,54 μm , 26,54 μm e 28,96 μm , respectivamente. A faixa de distribuição de tamanho para as amostras MP9, 19 e 40% variaram de 0,5 a 63 μm , 0,5 a 53 μm e 0,7 a 170 μm , respectivamente.

De acordo com os valores calculados de Span (TABELA 13), as formulações contendo o composto *p*-DMB tendem a apresentar maior dispersão granulométrica do que as preparadas sem o atraente floral (grupo controle). Estes valores, relacionados com a uniformidade (homogeneidade) de tamanho das micropartículas, encontraram-se acima de 2 para as formulações MP(9%) e MP(19%), sendo portanto, as amostras consideradas polidispersas. De acordo com a literatura, os sistemas que apresentam valor de Span abaixo de 2 são considerados monodispersos (DOMINGUES, *et al.*, 2008).

Pela avaliação dos histogramas de tamanho de partícula obtidos para as formulações preparadas (FIGURA 52), é possível dizer que as amostras MP0% e MP19% apresentaram uma distribuição de tamanho mais homogênea, unimodal, que segue o perfil ideal de uma gaussiana. Enquanto que as amostras MP9% e MP40% mostraram distribuição heterogênea, bimodal, o que não se aproxima de uma gaussiana ideal. Estas observações, de certa forma, estão de acordo com os valores crescentes obtidos para diâmetro médio de partículas, já que estes são influenciados pela propriedade hidrofóbica do núcleo contendo *p*-DMB (RIEKES *et al.*, 2011; HU *et al.*, 2003).

Lembrando que todas as amostras foram preparadas com a mesma massa de polímero PHBV, segundo as mesmas condições e concentrações diferentes do atraente floral, foi observado um aumento do diâmetro médio para todas as formulações estudadas, com a presença do *p*-DMB. Está evidente que a composição química do material de núcleo (atraente floral) é a principal razão para o aumento nos valores de diâmetro de partículas.

De acordo com Grillo e colaboradores (2011), aumento observado nos valores de diâmetros médios e na faixa granulométrica das micropartículas está relacionado com a encapsulação do princípio ativo, assim como já relatado para outras moléculas bioativas.

Portanto quanto maior a quantidade de *p*-DMB adicionada no preparo das formulações, maior será o diâmetro das micropartículas preparadas, devido às propriedades hidrofóbicas do atraente floral *p*-DMB. O contrário foi observado em estudo realizado por Hu e colaboradores (2003). Diferentemente do sistema estudado neste trabalho, conforme a quantidade de polietileno glicol (PEG) foi aumentada na composição das amostras, menor foi o diâmetro médio observado para as partículas obtidas. Isto ocorreu porque polímeros anfifílicos apresentam a tendência em migrar para o meio aquoso presente no método, devido à sua solubilidade parcial em água.

Então é possível concluir que tanto o tamanho médio de partícula assim como a distribuição de tamanho, é dependente da composição química das micropartículas.

TABELA 13 – DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA DAS MICROPARTÍCULAS DE PHBV: MP0% (SEM ATRAENTE FLORAL), MP9% (9% DE *p*-DMB m/m), MP19% (19% DE *p*-DMB m/m) E MP40% (40% DE *p*-DMB m/m)

| Amostras | Diâmetro médio (µm) | d(0,1) µm | d(0,5) µm | d(0,9) µm | SPAN |
|----------|---------------------|-----------|-----------|-----------|------|
| MP(0%) | 16,65 | 2,07 | 16,11 | 30,06 | 1,73 |
| MP(9%) | 23,54 | 4,82 | 18,42 | 48,89 | 2,39 |
| MP(19%) | 26,54 | 7,00 | 21,62 | 52,54 | 2,10 |
| MP(40%) | 28,96 | 6,55 | 26,59 | 53,22 | 1,75 |

NOTA: D(0,1 µm): DIÂMETRO DE PARTÍCULA CORRESPONDENTE A 10% DA DISTRIBUIÇÃO ACUMULADA; D(0,5 µm): DIÂMETRO DE PARTÍCULA A 50% DA DISTRIBUIÇÃO ACUMULADA; D(0,9 µm): DIÂMETRO DE PARTÍCULA A 90% DA DISTRIBUIÇÃO ACUMULADA; SPAN: DISPERSÃO GRANULOMÉTRICA

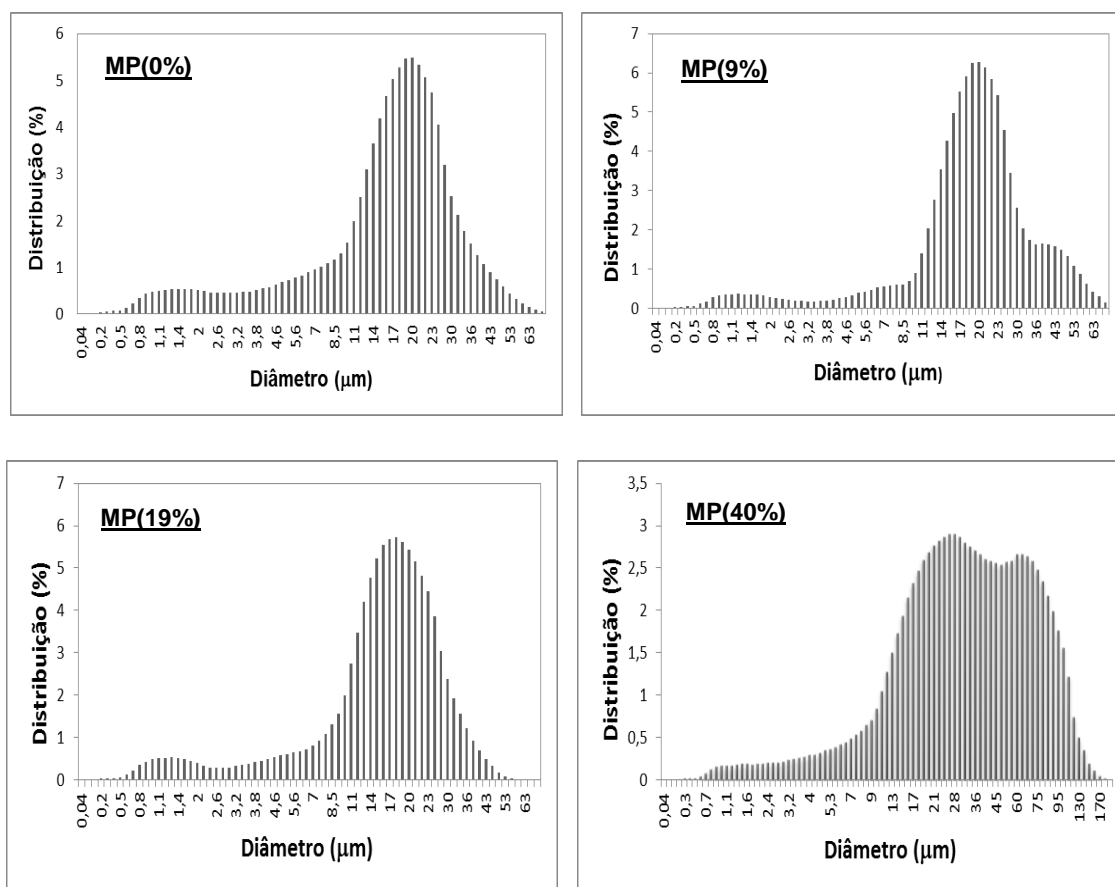


FIGURA 52 – HISTOGRAMAS DE DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DE PARTÍCULAS PARA AS MICROPARTÍCULAS DE PHBV

5.3.DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DO *p*-DMB PARA AS MICROPARTÍCULAS DE PHBV: MÉTODOS DIRETO E INDIRETO

5.3.1. Método direto – determinação por espectrofotometria no ultravioleta e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Para a determinação da eficiência de encapsulação pelo método direto, por meio da espectrofotometria na região do ultravioleta, uma curva analítica do *p*-DMB em clorofórmio foi construída, em concentrações na faixa de 8×10^{-5} a 3×10^{-4} mol.L⁻¹.

Os espectros de absorção das soluções de *p*-DMB de concentrações conhecidas mostraram dois picos de absorção máxima: em 240nm e em 291nm

(FIGURA 53). O pico escolhido para quantificação e construção da curva analítica foi o em 240nm. A escolha do pico em 240 nm para quantificação do atraente floral foi baseada na transição de energia de compostos aromáticos (*p*-DMB) que apresentam uma variação de energia alta, o que resulta em um comprimento de onda menor.

A curva analítica foi obtida, por meio da leitura espectrofotométrica na região do ultravioleta, na faixa entre 400 e 200nm, de cinco soluções do *p*-DMB em concentrações diferentes e crescentes, e revelou uma regressão linear significativa (FIGURA 54), com um coeficiente de correlação linear (r^2) igual a 0,9969. A equação de reta $y = 2958x - 0,01713$ representa a curva analítica construída, no qual o coeficiente de absorvidade molar (ϵ), correspondente ao coeficiente angular da reta (inclinação), foi de 2958 L.mol⁻¹.cm⁻¹ e o coeficiente linear foi de 0,01713 unidades arbitrária (u.a.).

A determinação do coeficiente de absorvidade molar (ϵ) foi de fundamental importância para uso da lei de Lambert-Beer (**A=ε.b.c**), para cálculo das concentrações de *p*-DMB incorporado. De acordo com a lei de Beer, **A** corresponde à absorvância máxima determinada, ϵ é o coeficiente de absorvidade molar obtido no comprimento de máxima absorção, **b** é o caminho ótico da cubeta de quartzo utilizada e por fim, **c** é a concentração molar encontrada nas soluções.

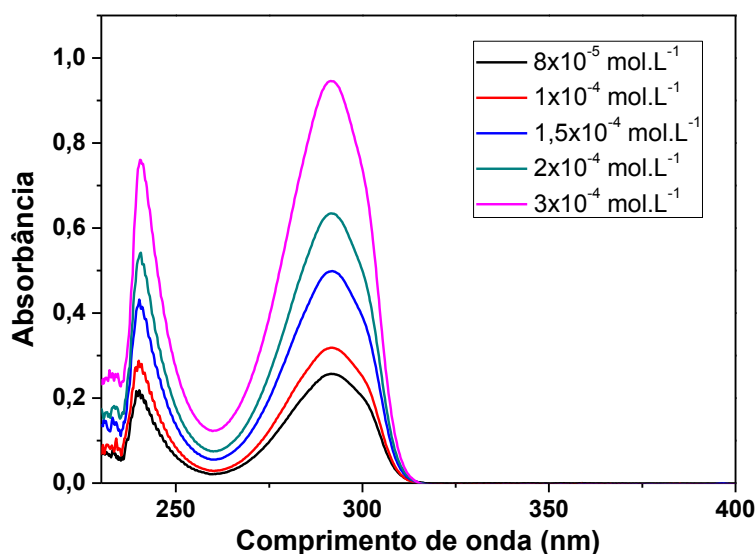


FIGURA 53 – ESPECTROS DE ABSORÇÃO DO *p*-DMB EM CLOROFÓRMIO, DE CONCENTRAÇÕES CONHECIDAS

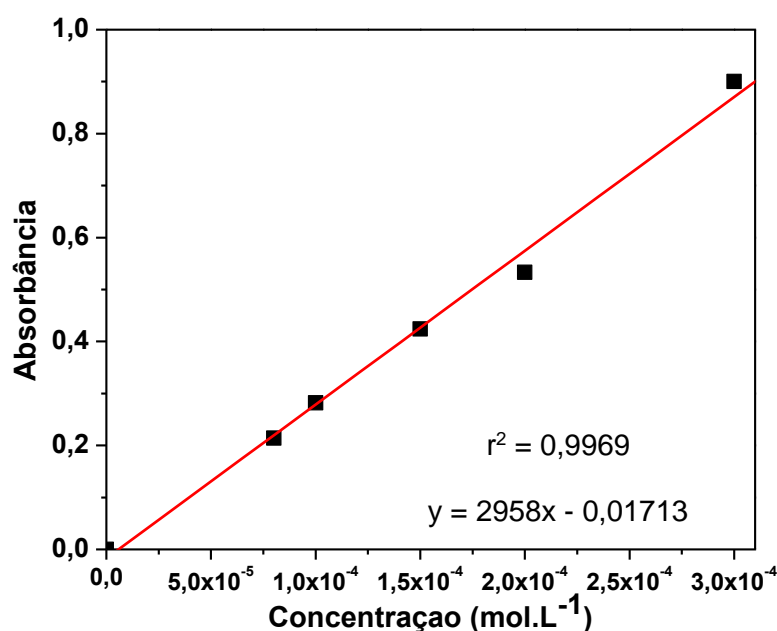


FIGURA 54 – CURVA ANALÍTICA DO *p*-DMB OBTIDA EM CLOROFÓRMIO NO COMPRIMENTO DE ONDA EM 240nm

O método direto foi feito dissolvendo uma quantidade conhecida de micropartículas, no qual os espectros de absorção das soluções clorofórmicas de *p*-DMB obtidas (FIGURA 55), provenientes de cada amostra de micropartículas avaliadas neste estudo, mostraram um pico máximo de absorção em 240nm, como observado para as soluções do *p*-DMB em clorofórmio (soluções de concentrações conhecidas) com ombro discreto em 285nm.

A partir da avaliação quantitativa dos espectros das amostras foi possível determinar a taxa de incorporação do *p*-DMB no interior das micropartículas. Ocorreu decréscimo nos valores de porcentagem de encapsulação, diretamente proporcional à quantidade de atraente floral adicionada nas formulações MP9%, MP19% e MP40% (TABELA 14). As taxas de encapsulação obtidas podem ser explicadas pela perda de massa do *p*-DMB durante o processo de evaporação do solvente, etapa esta lenta. Além disso, no processo de secagem, à temperatura ambiente, a amostra na qual foi adicionada maior quantidade de atraente floral, perde o composto por processos de volatilização mais facilmente já que, possivelmente, grande parte do *p*-DMB incorporado encontra-se próximo à superfície das micropartículas preparadas.

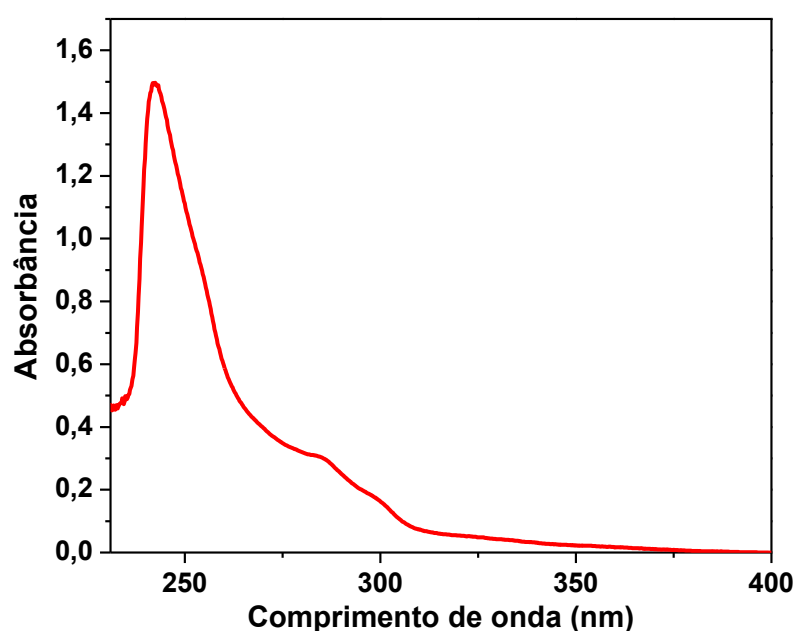


FIGURA 55 – ESPECTRO DE ABSORÇÃO DA SOLUÇÃO CLOROFÓRMICA DE *p*-DMB PROVENIENTE DA FORMULAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS MP40% (40% DE *p*-DMB m/m)

TABELA 14 – FORMULAÇÕES DE MICROPARTÍCULAS DE PHBV, COM DIFERENTES E CRESCENTES QUANTIDADES DE *p*-DMB, SUAS RESPECTIVAS PORCENTAGENS DE INCORPORAÇÃO, QUANTIFICADAS PELO MÉTODO DO ULTRAVIOLETA E VISÍVEL (UV-VIS) PELO MÉTODO DIRETO E PERDAS DE MASSA DO *p*-DMB, DURANTE A ETAPA DE EVAPORAÇÃO DO SOLVENTE

| Amostras de PHBV | Composição das amostras de PHBV | | | Eficiência de encapsulação ^d | |
|------------------|---------------------------------|-------------------------|-----------------------------------|---|--------------------------------|
| | PHBV ^a (g) | PVA ^b (g) | <i>p</i> -DMB ^c (g) | Perda de massa (%) ^e | Método direto (%) ^f |
| MP (0%) | 2 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| MP (9%) | 2 | 4 | 0,18 | 68,47 | 57,85 ± 0,58 |
| MP (19%) | 2 | 4 | 0,38 | 37,33 | 19,76 ± 11,76 |
| MP (40%) | 2 | 4 | 0,80 | 8,11 | 9,62 ± 5,70 |

^a 40 ML DE SOLUÇÃO CLOROFÓRMICA DE PHBV À 5% (M/V)

^b 200 ML DE SOLUÇÃO AQUOSA DE PVA À 2% (M/V)

^c *p*-DMB SIGMA-ALDRICH (9,19,40,70 E 90% m/m COM RELAÇÃO À MASSA DE PHBV)

^d EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DETERMINADA POR UV-VIS

^e DETERMINAÇÃO DE PERDA DE MASSA INICIAL DE *p*-DMB ADICIONADO EM CADA FORMULAÇÃO, NA ETAPA DE EVAPORAÇÃO DE SOLVENTE, MEDIÇÃO FEITA EM BALANÇA ANALÍTICA

^f DETERMINAÇÃO DO TEOR DE *p*-DMB INCORPORADO NO INTERIOR DAS MICROPARTÍCULAS (ESTUDO FEITO EM DUPLICATA)

Por meio da cromatografia líquida de alta eficiência com detector na região do ultravioleta foi possível observar duas bandas de absorção importantes nesta região, para o *p*-DMB. A banda principal foi obtida no comprimento de onda em 223nm e a outra, considerada secundária, foi determinada em 285nm como mostrado pelo cromatograma típico do atraente floral nos comprimentos de onda avaliados (FIGURA 56).

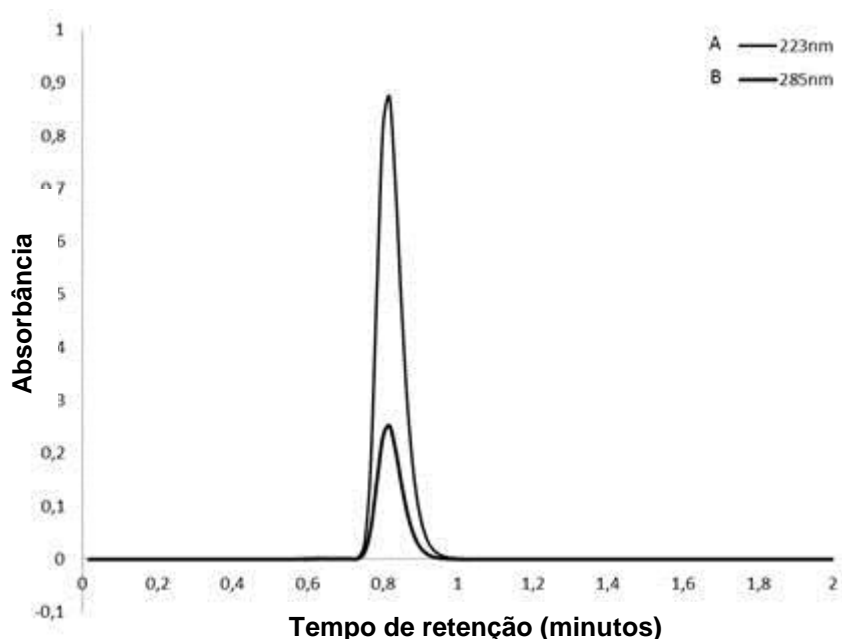


FIGURA 56 – CROMATOGRAMA DA SOLUÇÃO DE *p*-DMB NA CONCENTRAÇÃO DE 50 μ g.mL⁻¹ EM METHANOL 70% EM ÁGUA ULTRAPURA A UM FLUXO DE 0,8 mL.min⁻¹ EM COLUNA KINETEX HILIC 100A , A – COMPRIMENTO DE ONDA EM 223nm E B – COMPRIMENTO DE ONDA EM 285nm

A validação do método foi feita para os dois comprimentos de onda relatados. Nas condições empregadas na análise, o *p*-DMB eluiu em $0,814 \pm 0,005$ minutos, com desvio padrão relativo da ordem de 0,66. Ficou evidente que o sistema empregado apresentou boa reprodutibilidade com base no desvio padrão relativo do tempo de retenção do *p*-DMB.

Para validar o método, doze concentrações diferentes de *p*-DMB foram preparadas as quais ajudaram a definir o limite de detecção (LD), o limite de quantificação (LQ) e a faixa linear do método. A precisão foi avaliada por cinco

blocos com doze soluções cada de concentrações diferentes e crescentes. As soluções foram preparadas em dias diferentes e cada uma foi injetada em triplicata.

Especificamente, a mais baixa concentração foi $1,125\mu\text{g.mL}^{-1}$ e a mais alta foi $200\mu\text{g.mL}^{-1}$. Ao considerar o limite de detecção como uma razão 3:1 sinal/ruído, a concentração mais baixa foi próxima desta razão. Por outro lado, esta mesma concentração mostrou-se aproximadamente uma razão 10:1 sinal/ruído para o comprimento de onda em 285nm. Este fato pode ser explicado pelo processo de reflexão ao usar o solvente metanol na região do ultravioleta.

Portanto, a quantidade mínima de *p*-DMB responsável por alcançar a razão 10:1 sinal/ruído foi de aproximadamente $4,3\mu\text{g.mL}^{-1}$, para o comprimento de onda em 223nm. Para o comprimento de onda em 285nm, esta razão 10:1 sinal/ruído foi obtida pela concentração de $1,125\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Com base nos valores de limite de quantificação (LQ) obtidos, duas curvas analíticas foram construídas para investigar a linearidade, uma em 223nm e outra em 285nm. A linearidade foi medida por plotar e analisar a relação da concentração de *p*-DMB versus a área do pico, referente a cada concentração.

A curva em 223nm foi composta por sete concentrações diferentes e mostrou ser linear na faixa de 4,35 a $100\mu\text{g.mL}^{-1}$. A equação de reta referente à regressão é apresentada na FIGURA 57, e o coeficiente de correlação linear (r^2) foi satisfatório (>0.998). A curva analítica em 285nm foi composta por dez concentrações diferentes e exibiu linearidade na faixa de 1,125 a $200\mu\text{g.mL}^{-1}$. A equação de reta e o valor de r^2 (>0.999) são mostrados (FIGURA 58).

Portanto, a curva em 285nm é mais robusta que a curva em 223nm. Pode ser observado uma excelente faixa de linearidade com um coeficiente de correlação de 0,9999. Este comprimento de onda não possui forte influência do ruído, como o observado para o comprimento de onda em 223nm.

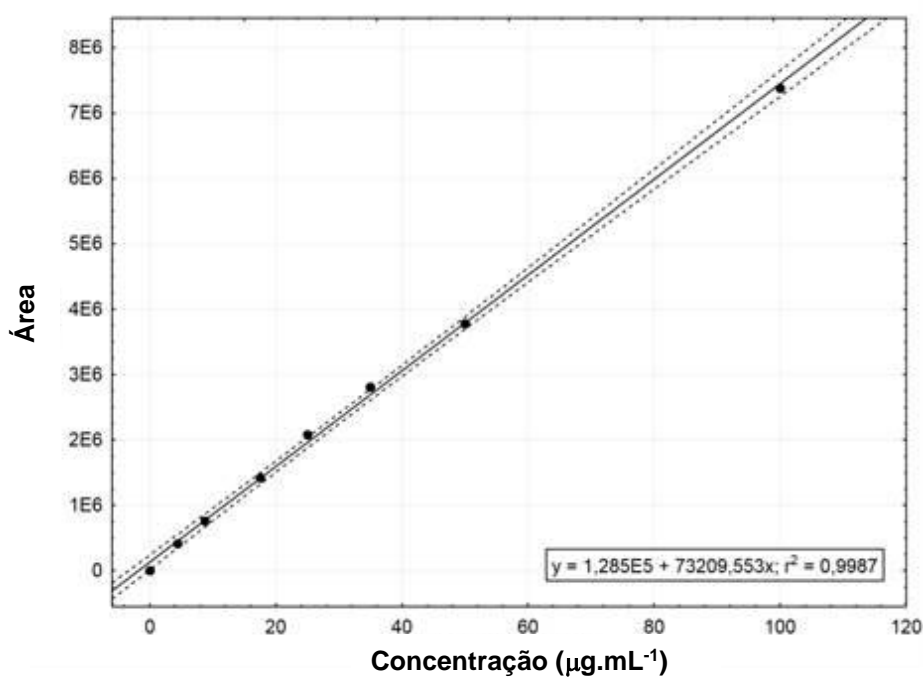


FIGURA 57 – CURVA ANALÍTICA DO *p*-DMB NO COMPRIMENTO DE ONDA EM 223nm, COM 95% DE INTERVALO DE CONFIANÇA

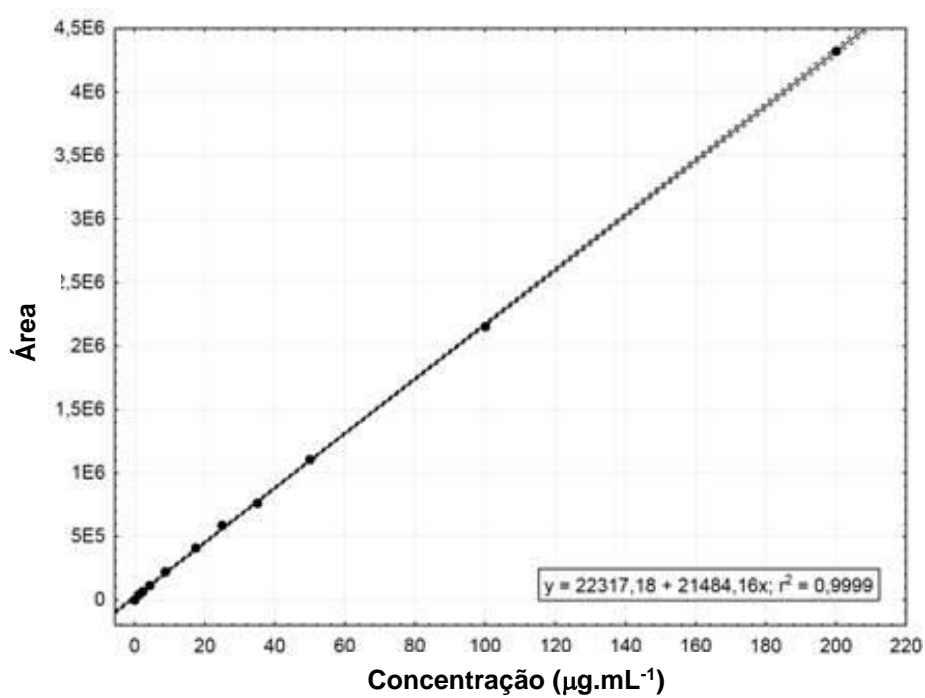


FIGURA 58 - CURVA ANALÍTICA DO *p*-DMB NO COMPRIMENTO DE ONDA EM 285nm, COM 95% DE INTERVALO DE CONFIANÇA

A precisão do método de CLAE foi determinada pela análise do desvio padrão e valores de variância obtidos por meio das soluções de *p*-DMB. Estes valores são mostrados na TABELA 15 e, a partir deles, é possível confirmar uma boa precisão. Nesta situação, a análise da variância é mais importante que o desvio padrão pois é a única que varia de acordo com a concentração do *p*-DMB. Por outro lado, a análise da variância, também chamada de desvio padrão relativo (DPR) é uma medida direta da precisão, correlacionando a porcentagem do desvio padrão e concentração média. Considerando os valores na TABELA 15, fica claro dizer que o método em 223nm é mais preciso, com um erro abaixo de 5% para quase todas as soluções.

O método em 285nm também mostrou uma boa precisão (TABELA 16), o desvio padrão relativo para concentrações médias e altas de *p*-DMB estão abaixo de 5% para quase todas as soluções avaliadas enquanto que, para a região de baixas concentrações de atraente floral, foram encontrados os valores de 19% ($1,125\mu\text{g.mL}^{-1}$) e 13% ($2,25\mu\text{g.mL}^{-1}$).

TABELA 15 – PRECISÃO DETERMINADA PELA CURVA ANALÍTICA DO *p*-DMB EM 223nm

| Soluções ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) | Área | DP* | DPR (%)** |
|------------------------------------|---------|--------|-----------|
| 4,375 | 412660 | 19165 | 5 |
| 8,75 | 761505 | 21132 | 3 |
| 17,5 | 1417406 | 39155 | 3 |
| 25 | 2077912 | 61002 | 3 |
| 35 | 2810012 | 146321 | 5 |
| 50 | 3782601 | 206506 | 5 |
| 100 | 7382060 | 276490 | 4 |

NOTA: *DESVIO PADRÃO

**DESVIO PADRÃO RELATIVO

TABELA 16 – PRECISÃO DETERMINADA PELA CURVA ANALÍTICA DO *p*-DMB EM 285nm

| Soluções ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) | Area | DP* | DPR (%)** |
|--|-------------|------------|------------------|
| 1,125 | 39686 | 7376 | 19 |
| 2,25 | 66561 | 8492 | 13 |
| 4,375 | 113368 | 2988 | 3 |
| 8,75 | 223387 | 4229 | 2 |
| 17,5 | 410225 | 8958 | 2 |
| 25 | 586929 | 26536 | 5 |
| 35 | 796317 | 40322 | 5 |
| 50 | 1105158 | 59761 | 5 |
| 100 | 2154878 | 100645 | 5 |
| 200 | 4322135 | 161609 | 4 |

NOTA: *DESVIO PADRÃO

**DESVIO PADRÃO RELATIVO

A exatidão do método foi avaliada pela análise de uma solução de *p*-DMB de concentração conhecida. A recuperação de três soluções empregadas como padrão é mostrada na TABELA 17. O método mostrou bons valores de recuperação para ambos os comprimentos de onda. E o erro de quantificação encontrado foi próximo à variância das respectivas soluções avaliadas para construção das curvas analíticas, anteriormente mencionadas. Esta observação leva a crer que um método confiável foi desenvolvido, para ambos os comprimentos de onda. Mas, ao levar em conta o erro de quantificação, o método em 223nm mostrou-se melhor.

TABELA 17 – ANÁLISE DAS SOLUÇÕES DE *p*-DMB NO COMPRIMENTO DE ONDA 223nm, POR CLAE

| Concentração <i>p</i> -DMB ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) | Concentração de <i>p</i> -DMB calculada pelo método ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) | | Erro de quantificação(%) | |
|---|--|--------|--------------------------|-------|
| | 223nm | 285nm | 223nm | 285nm |
| 99,6 | 97,93 | 102,52 | -1,67 | 2,93 |
| 9,96 | 9,7 | 9,26 | -2,65 | -7,01 |
| 4,98 | 5,37 | 5,3 | 7,87 | 6,48 |

O método por CLAE validado para quantificar o *p*-DMB foi aplicado para os extratos obtidos a partir das micropartículas, como forma de avaliar a eficiência de encapsulação do processo. As amostras foram quantificadas em 223nm considerando o menor erro obtido para esse comprimento de onda, respeitando a faixa linear da curva analítica. Logo, uma nova curva analítica foi construída com concentrações de *p*-DMB que variaram de 4 a $100\mu\text{g.mL}^{-1}$. A TABELA 18 mostra os resultados para o *p*-DMB quantificado nos extratos das micropartículas. Os valores de desvio padrão para as amostras analisadas, em triplicata, foram baixos e a concentração obtida para cada amostra foi alocada na faixa de linearidade para 223nm.

TABELA 18 – QUANTIFICAÇÃO DO *p*-DMB INCORPORADO NAS MICROPARTÍCULAS NO COMPRIMENTO DE ONDA 223nm, POR CLAE

| Amostras | Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)* | Massa <i>p</i> -DMB (mg)* | Eficiência encapsulação (EE) (%)** |
|----------|---|---------------------------|------------------------------------|
| MP9% | 40,2 \pm 0,15 | 3,6 | 40,2 |
| MP19% | 27,0 \pm 0,04 | 5,1 | 27,0 |
| MP40% | 54,4 \pm 0,81 | 21,8 | 54,4 |

NOTA: *CONCENTRAÇÃO E MASSA DETERMINADA PELO MÉTODO CLAE

**DETERMINAÇÃO FEITA EM TRIPLICATA

Dos resultados de quantificação obtidos, é claro dizer que o método validado é mais sensível quando comparado com a avaliação por espectrofotometria no ultravioleta, anteriormente discutida.

5.3.2. Método indireto – determinação por espectrofotometria no ultravioleta

As análises das soluções do *p*-DMB preparadas em solução aquosa de PVA na faixa de 5×10^{-5} a $2,5 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹, mostraram pico de absorção máxima em 223 nm (FIGURA 59), na faixa de comprimento de onda estudada (de 400 a 200 nm), no qual a curva analítica apresentou uma regressão linear significativa, com um coeficiente de correlação linear (r^2) da ordem de 0,9926 (FIGURA 60).

A equação de reta $y = 7188x + 0,06143$, para este método, representa a curva analítica construída, no qual o coeficiente de absorvidade molar (ϵ), correspondente ao coeficiente angular da reta foi de 7188 L.mol⁻¹.cm⁻¹ e o coeficiente linear foi de 0,06143 unidades arbitrária (u.a.). Como relatado anteriormente, a lei de Lambert-Beer foi também utilizada.

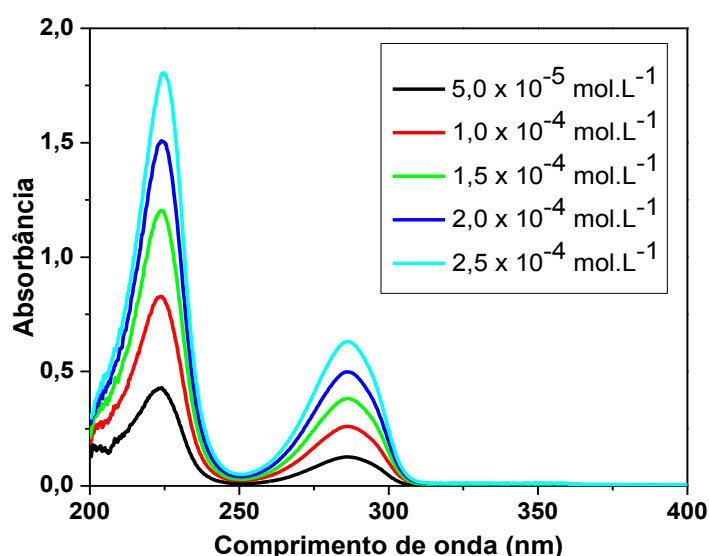


FIGURA 59 – ESPECTROS DE ABSORÇÃO DO *p*-DMB, EM SOLUÇÃO AQUOSA DE PVA NA CONCENTRAÇÃO DE 2% (m/V), DE CONCENTRAÇÕES CONHECIDAS

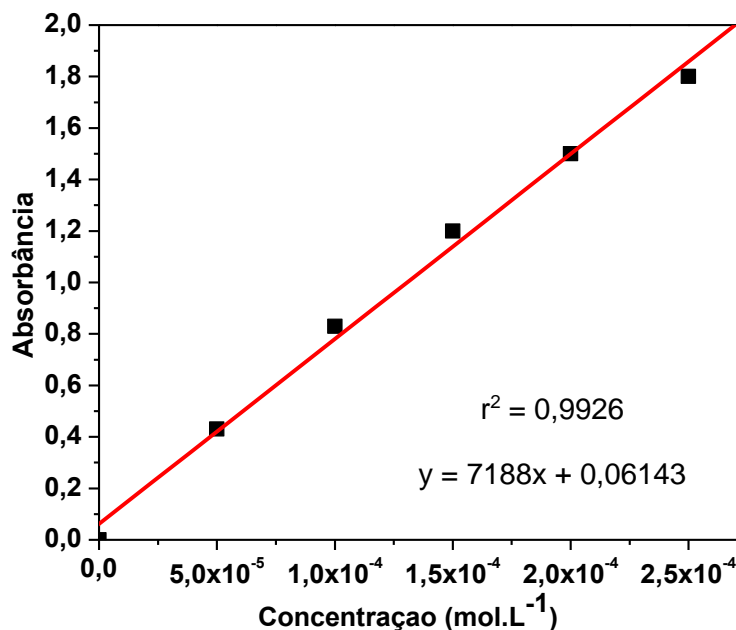


FIGURA 60 – CURVA ANALÍTICA DO *p*-DMB OBTIDA EM SOLUÇÃO AQUOSA DE PVA NA CONCENTRAÇÃO DE 2% (m/V) NO COMPRIMENTO DE ONDA EM 223nm

Os espectros de absorção dos sobrenadantes (FIGURA 61), provenientes de cada amostra de micropartículas desenvolvidas neste estudo, mostraram um pico máximo de absorção em 223 nm, idêntico aos obtidos para as soluções do *p*-DMB em solução aquosa de PVA a 2% (m/V).

A avaliação quantitativa por UV-Vis dos sobrenadantes permitiu determinar a taxa de encapsulação do *p*-DMB. Foi observado que ocorreu um aumento nos valores de encapsulação, diretamente proporcional à quantidade de atraente floral adicionada nas formulações MP9%, MP19% e MP40% (TABELA 19).

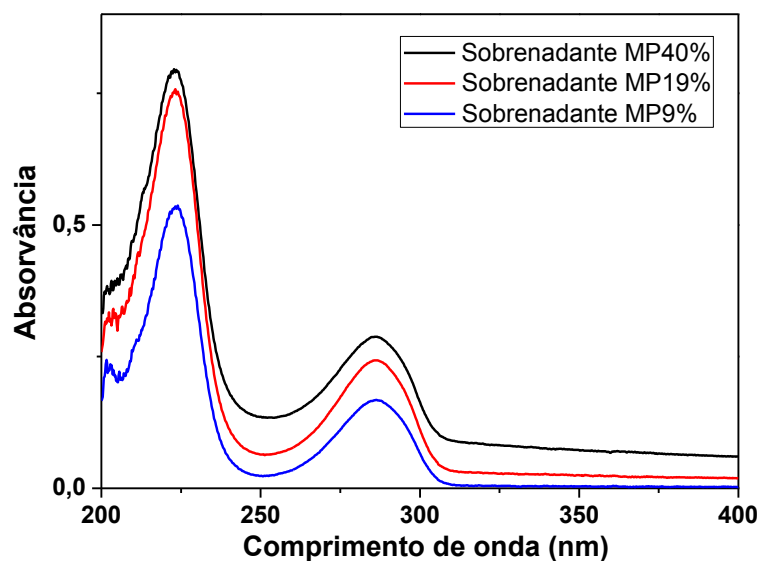


FIGURA 61 – ESPECTROS DE ABSORÇÃO DOS SOBRENADANTES AQUOSOS PROVENIENTES DAS FORMULAÇÕES DE MICROPARTÍCULAS MP9% (9% DE *p*-DMB m/m), MP19% (19% DE *p*-DMB m/m) E MP40% (40% DE *p*-DMB m/m)

TABELA 19 – FORMULAÇÕES DE MICROPARTÍCULAS DE PHBV, COM DIFERENTES E CRESCENTES QUANTIDADES DE *p*-DMB, SUAS RESPECTIVAS PORCENTAGENS DE INCORPORAÇÃO, QUANTIFICADAS PELO MÉTODO DO ULTRAVIOLETA E VISÍVEL (UV-VIS) PELO MÉTODO INDIRETO E PERDAS DE MASSA DO *p*-DMB, DURANTE A ETAPA DE EVAPORAÇÃO DO SOLVENTE

| Amostras de PHBV | Composição das amostras de PHBV | | | Eficiência de encapsulação (%) ^d | |
|------------------|---------------------------------|-------------------------|-----------------------------------|---|----------------------------------|
| | PHBV ^a (g) | PVA ^b (g) | <i>p</i> -DMB ^c (g) | Perda de massa (%) ^e | Método Indireto (%) ^f |
| MP (0%) | 2 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| MP (9%) | 2 | 4 | 0,18 | 68,47 | 69,84 ± 3,48 |
| MP (19%) | 2 | 4 | 0,38 | 37,33 | 76,13 ± 0,50 |
| MP (40%) | 2 | 4 | 0,80 | 8,11 | 90,5 ± 5,17 |

^a 40 mL DE SOLUÇÃO CLOROFÓRMICA DE PHBV À 5% (m/V)

^b 200 mL DE SOLUÇÃO AQUOSA DE PVA À 2% (m/V)

^c *P*-DMB SIGMA-ALDRICH (9,19,40,70 E 90% m/m COM RELAÇÃO À MASSA DE PHBV)

^d EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DETERMINADA POR UV-VIS

^e DETERMINAÇÃO DE PERDA DE MASSA INICIAL DE *p*-DMB ADICIONADO EM CADA FORMULAÇÃO, NA ETAPA DE EVAPORAÇÃO DE SOLVENTE, MEDIÇÃO FEITA EM BALANÇA ANALÍTICA

^f DETERMINAÇÃO DO TEOR DE *p*-DMB INCORPORADO NO INTERIOR DAS MICROPARTÍCULAS PELA AVALIAÇÃO DO SOBRENADANTE (SOLUÇÃO AQUOSA DE PVA ARMAZENADA) (ESTUDO FEITO EM DUPLICATA)

Esta taxa de encapsulação elevada pode ser explicada por dois motivos. Pela eficiência no processo de formação da emulsão do tipo óleo em água (O/A) do método utilizado, além da baixa solubilidade do composto em meio aquoso, visto que o seu valor de $\log K_{ow} = 2,04$. O processo utilizado propicia o acondicionamento dos cristais de *p*-DMB no interior do polímero PHBV, o qual também possui baixa solubilidade em água. Este processo leva à precipitação do polímero na forma de micropartículas contendo o atraente floral incorporado.

Ao comparar as TABELAS 14, 18 e 19, os valores obtidos de eficiência de encapsulação pelo método direto UV-Vis e CLAE e indireto, respectivamente, apresentaram diferenças significativas. As eficiências obtidas pelo método direto mostraram-se próximas, levando-se em consideração os desvios-padrão determinados, com exceção aos valores determinados para a amostra MP40%.

Essa diferença é possível já que as amostras analisadas não foram as mesmas, ou seja, amostras preparadas a vários dias foram utilizadas na determinação pelo método direto UV-Vis enquanto que partículas recém preparadas foram usadas na quantificação do atraente floral por CLAE. A determinação por UV-Vis deveria ser repetida com amostras recém preparadas, visto que o *p*-DMB é um composto volátil.

O próprio processo de secagem das micropartículas à temperatura ambiente pode vir a ser o responsável pelas perdas do atraente floral volátil e, desta forma, comprometer a quantificação.

O método indireto UV-Vis mostrou resultados maiores e, portanto, satisfatórios porque os sobrenadantes analisados foram armazenados em recipientes fechados na geladeira, o que anula os processos de volatilização do atraente floral. É seguro dizer que o método indireto é mais confiável na determinação do *p*-DMB encapsulado.

Logo, pelas técnicas de caracterização empregadas anteriormente e pela determinação da eficiência de encapsulação pelos métodos direto e indireto é possível confirmar a encapsulação do atraente floral *p*-DMB nas micropartículas de PHBV.

5.4. ESTUDO DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* DO *p*-DMB NAS PARTÍCULAS DE PHBV

Por meio do método de adição de padrão interno foi possível construir uma curva analítica do *p*-DMB, por meio da cromatografia em fase gasosa (FIGURA 62), em que foram apresentadas na abscissa (eixo *x*), as concentrações conhecidas das soluções do *p*-DMB, às quais foi adicionada uma quantidade conhecida do padrão interno benzoato de metila ($0,4\text{mg.mL}^{-1}$), e na ordenada (eixo *y*), a razão entre as áreas do *p*-DMB e benzoato de metila.

De acordo com a literatura, análises quantitativas, por meio da cromatografia em fase gasosa, são realizadas com maior precisão ao utilizar o método de padronização interna. Já que este tipo de metodologia minimiza erros de injeção da amostra devido às pequenas quantidades injetadas e variações instrumentais (LIGIERO *et al.*, 2009; COLLINS *et al.*, 1990).

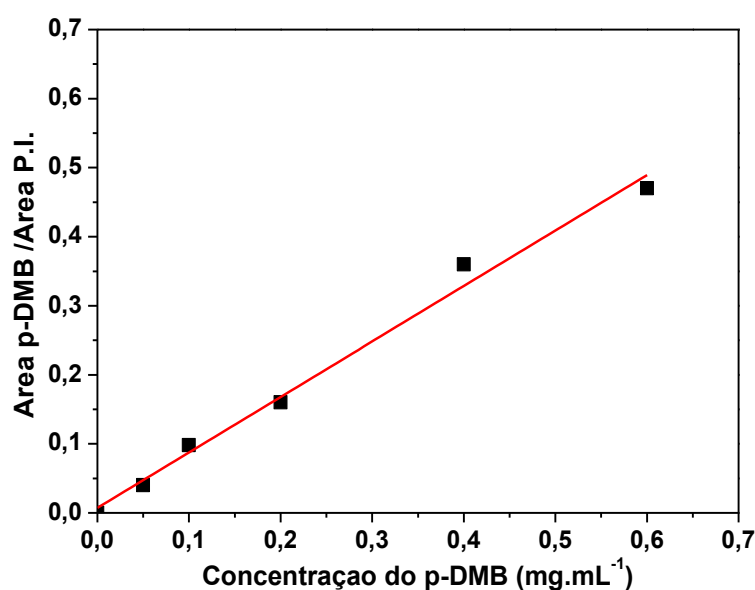


FIGURA 62 – CURVA ANALÍTICA OBTIDA PELO MÉTODO DE PADRÃO INTERNO BENZOATO DE METILA

O benzoato de metila foi escolhido por ser similar ao atraente floral a ser quantificado, no que diz respeito aos tempos de retenção de ambos, ser inerte, não

fazer parte da composição das amostras analisadas e por apresentar um pico bem resolvido com relação aos demais componentes da amostra (COLLINS *et al.*, 1990).

As amostras utilizadas nos ensaios de liberação foram as quantificadas pelo método direto: espectrofotometria no ultravioleta e visível (UV-Vis).

Assim, pelos cromatogramas (FIGURA 63) obtidos a partir da análise dessas amostras de aeração das micropartículas de PHBV (MP9%, MP19% e MP40%), contendo o atraente floral volátil, e após adição de solução metanólica do padrão interno benzoato de metila, na concentração de $0,4\text{mg.mL}^{-1}$, foi observado picos característicos do padrão interno e *p*-DMB, no tempo de retenção (T_r) de 4,75 minutos e no tempo de 5,75 minutos, respectivamente. Como o volume de cada amostra coletada, por cada dia avaliado (6 dias no total), foi de 1,5mL (vial), a concentração do padrão interno foi recalculada e determinada como $0,026\text{mg.mL}^{-1}$.

Todos os cromatogramas obtidos, durante os seis dias do ensaio de liberação das amostras de micropartículas, mostraram o mesmo perfil dos coletados após 24 horas para cada formulação (MP9%, MP19% e MP40%) (FIGURA 63).

Todas as amostras de aeração foram analisadas, pela cromatografia em fase gasosa, após adição da solução metanólica do benzoato de metila. Pela a razão das áreas do *p*-DMB e padrão interno foi possível determinar as concentrações do *p*-DMB nestas amostras. E por meio das concentrações obtidas, foi determinada a quantidade em massa do atraente floral, liberado em cada dia de estudo (TABELA 20).

Em 0,5g de micropartículas MP9%, MP19% e MP40% utilizados nos ensaios de liberação, foram determinados 8, 10 e 12mg de *p*-DMB incorporado, com base na eficiência de encapsulação determinada por espectrofotometria na região do ultravioleta pelo método direto (TABELA 14). As massas cumulativas liberadas de atraente floral, durante os seis dias de ensaios, foram 0,966, 0,309 e 1,566mg por grama de micropartículas (TABELA 20), correspondente a 6%, 1,6% e 7% de liberação por grama de partículas. Essa quantidade poderia ser aumentada com aumento da temperatura, o que não foi possível nas condições laboratoriais, pois a câmara de aeração não estava totalmente isolada do ambiente externo ($T=20^{\circ}\text{C}$).

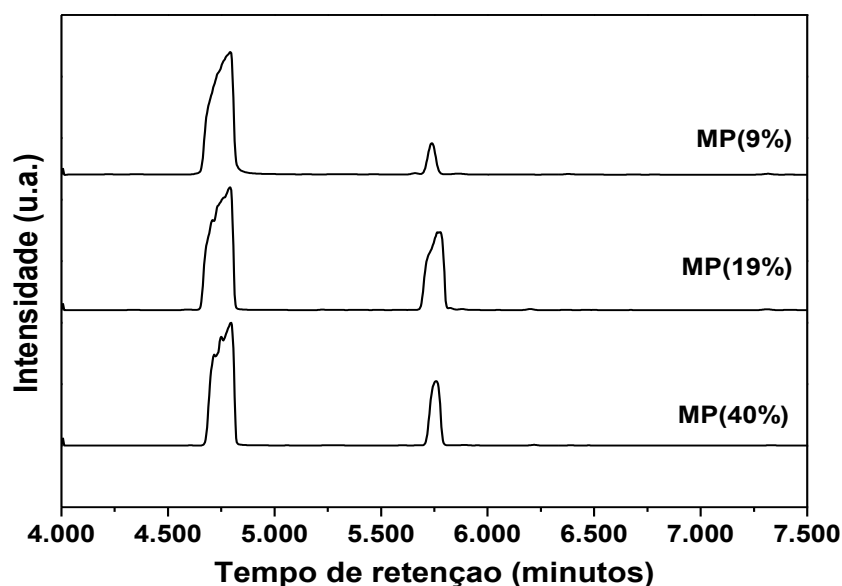


FIGURA 63 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS A PARTIR DA AERAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS DE PHBV CONTENDO *p*-DMB E APÓS ADIÇÃO DA SOLUÇÃO DO PADRÃO INTERNO BENZOATO DE METILA, DURANTE 24 HORAS.

TABELA 20 – QUANTIDADES LIBERADAS DO *p*-DMB A PARTIR DE MEIO GRAMA DE MICROPARTÍCULAS DE PHBV, DURANTE O PERÍODO DE SEIS DIAS, EM CÂMARA DE AERAÇÃO COM TEMPERATURA E UMIDADE CONTROLADAS (TEMPERATURA= $24 \pm 3^\circ\text{C}$ E UMIDADE= 20%)

| Amostras de PHBV | Massa Amostras (g) ^a | Massa <i>p</i> -DMB (mg) ^b | Massa liberada (mg.g ⁻¹) ^c | Massa de <i>p</i> -DMB liberada (dias) | | | | | |
|------------------|---------------------------------|---------------------------------------|---|--|--------|--------|--------|--------|--------|
| | | | | 1 (μg) | 2 (μg) | 3 (μg) | 4 (μg) | 5 (μg) | 6 (μg) |
| MP9% | 0,5 | 8 | 0,966 | 405 | 24 | 18 | 21 | 15 | 18 |
| MP19% | 0,5 | 10 | 0,309 | 33 | 40,5 | 33 | 27 | 21 | 13,6 |
| MP40% | 0,5 | 12 | 1,566 | 99 | 99 | 195 | 195 | 195 | 156 |

^a MASSA DE MICROPARTÍCULAS DE PHBV ADICIONADA NA CÂMARA DE AERAÇÃO.

^b MASSA DE *p*-DIMETOXIBENZENO INCORPORADA EM 0,5g DE MICROPARTÍCULAS DE PHBV.

^c MASSA DE *p*-DMB CALCULADA COM BASE NA QUANTIDADE CUMULATIVA LIBERADA, DURANTE OS SEIS DIAS DE ENSAIOS, LEVANDO EM CONSIDERAÇÃO 1g DE MICROPARTÍCULAS DE PHBV.

A determinação qualitativa do *p*-DMB foi realizada por meio da avaliação dos espectros de massas por ionização por impacto de elétrons, obtidos para as soluções padrão do atraente floral avaliadas para construção da curva analítica já relatada. Os espectros foram registrados como um gráfico de abundância de íons (intensidade dos fragmentos, na vertical) contra a razão massa/carga (m/z), na horizontal (FIGURA 64).

Os espectros de massas obtidos para o *p*-DMB liberado do interior das micropartículas e para as soluções padrão avaliadas foram comparados com os espectros de massas da biblioteca do *National Institute of Standards and Technology* (NIST), uma base de dados espectrais de substâncias puras e outros componentes conhecidos, coincidindo, desta forma, com os dados do composto usado. De acordo com a literatura, os espectros de massa por impacto de elétrons é obtido rotineiramente pelo uso de um feixe de elétrons de 70 eV. Sabe-se que o evento mais simples que ocorre é a remoção de um elétron da molécula em sua fase gasosa, com a formação do íon molecular (cátion-radical). É importante ressaltar que o pico do íon molecular fornece a massa molecular do composto estudado. No caso de um espectrômetro de massas de resolução unitária, a massa molecular obtida é referente ao número inteiro mais próximo da massa molecular do composto (SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

Portanto, ao avaliar os espectros de massas das soluções provenientes das aerações de micropartículas de PHBV, os principais sinais são referentes à razão massa/carga (m/z) em 138 (FIGURA 64) que corresponde ao pico do íon molecular do *p*-DMB, este com um elétron a menos, removido pelo impacto do feixe de elétrons, incidente na amostra. O íon com 100% de abundância, com m/z 123, conhecido como pico base, referente ao íon molecular menos uma metila (CH_3) (M-15). E por último, o pico com razão m/z 95 correspondente ao íon do pico base menos um grupamento carbonila (C=O) (FIGURA 64).

Com relação à fragmentação do íon molecular m/z 138, ocorre uma cisão homolítica da ligação metoxila (O-CH_3), no qual cada elétron se desloca de forma independente em direção ao átomo de oxigênio ou ao grupamento metila, o que promove a formação do íon do pico base de m/z 123, com a perda do radical metila. Ocorre um rearranjo do íon do pico base, com perda de uma molécula de monóxido de carbono (CO) o que gera o íon de m/z 95 (FIGURA 65).

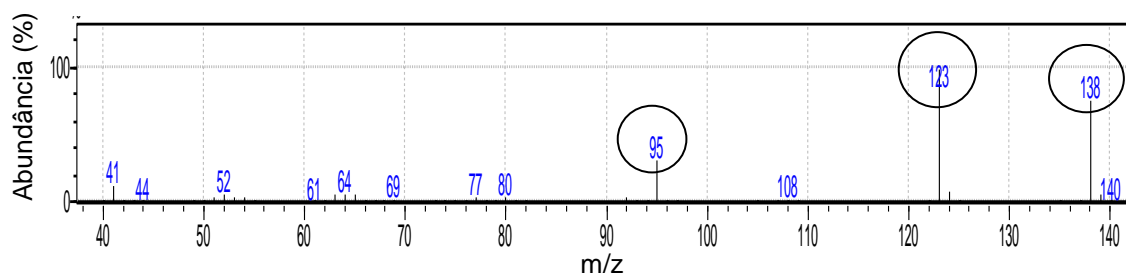


FIGURA 64 – ESPECTRO DE MASSAS (IMPACTO DE ELÉTRONS) DO *p*-DMB LIBERADO DO INTERIOR DAS MICROPARTÍCULAS DE PHBV

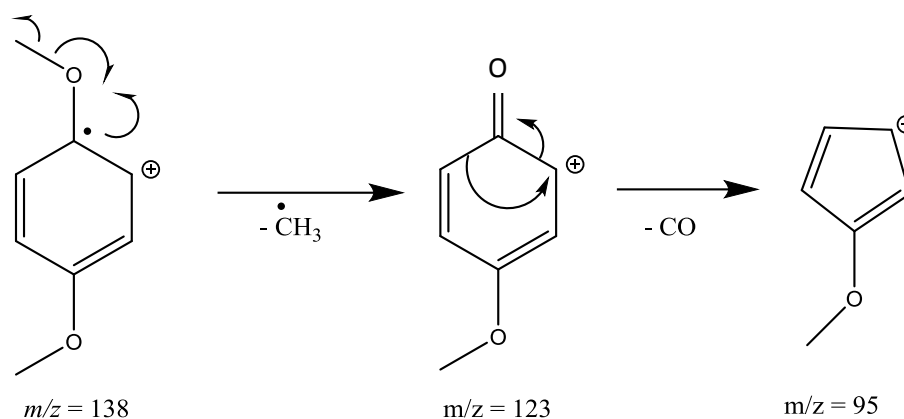


FIGURA 65 – ESQUEMA DA FRAGMENTAÇÃO QUE OCORRE A PARTIR DO ÍON MOLECULAR (m/z 138) QUE RESULTA NO PICO BASE (m/z 123), LEVANDO AO PICO DE m/z 95

Os ensaios de liberação das micropartículas de PHBV contendo o atraente floral forneceu o perfil de liberação do *p*-DMB em função do tempo (6 dias), na temperatura de $24 \pm 3^\circ\text{C}$ e umidade de 20% (FIGURA 66).

Os perfil de liberação *in vitro* do atraente floral (FIGURA 66) mostraram uma liberação lenta e controlada. Esta liberação lenta pode ser explicada pela baixa difusão do *p*-DMB por meio dos poros da matriz polimérica e pela distribuição do composto, preferencialmente, na porção mais interna das micropartículas de PHBV.

Segundo Bazzo e colaboradores (2009), ao contrário do apresentado neste trabalho, os fármacos piroxicam e cetoprofeno utilizados no preparo de micropartículas de PHBV/quitosana em seus estudos, foram liberados rapidamente

devido à rápida difusão do composto através dos poros e distribuição de ambos preferencialmente na superfície das micropartículas.

Os perfis de liberação do *p*-DMB mostraram que compostos dispersos na matriz polimérica predominantemente em sua forma cristalina apresentam uma menor solubilidade na matriz polimérica. Como o atraente floral é cristalino, este fator explica a baixa e lenta liberação do *p*-DMB das micropartículas de PHBV (BAZZO *et al.*, 2009).

De acordo com a literatura, esta baixa liberação observada no tempo estudado é um indicativo de que há pouco atraente floral localizado próximo à superfície das micropartículas enquanto que a maior parte do composto foi encapsulado no interior das cápsulas (HU *et al.*, 2003).

É possível sugerir que a cristalinidade do atraente floral e a presença de alguns poros fechados nas micropartículas de PHBV contendo o composto, levam à uma baixa permeabilidade do *p*-DMB. Este fenômeno também foi observado por Hu e colaboradores (2003).

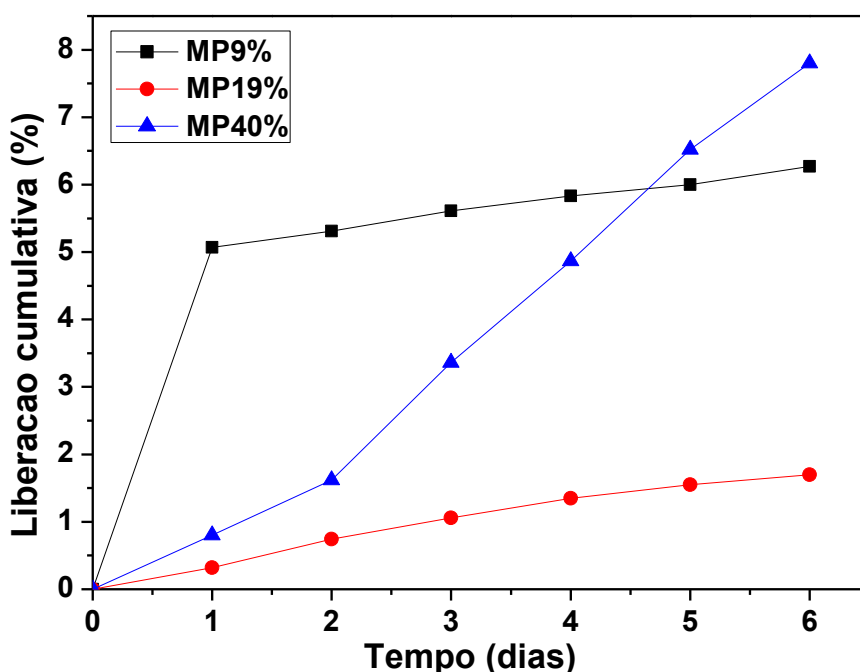


FIGURA 66 – CURVAS DE LIBERAÇÃO PARA AS MICROPARTÍCULAS CONTENDO O ATRAENTE FLORAL (MP9%, 19% E 40% m/m) (TEMPERATURA DE $24 \pm 3^{\circ}\text{C}$ E 20% DE UMIDADE)

Como pode ser observado, as amostras de micropartículas de PHBV apresentaram padrões de liberação diferentes. Para liberar, por exemplo, 1,5% do *p*-DMB foram necessários menos de 1, 5 e 2 dias para as amostras MP9%, MP19% e MP40%, respectivamente. Como forma de entender o mecanismo de liberação, o modelo cinético semi-empírico descrito por Korsmeyer-Peppas deveria ser adotado porque ele descreve a liberação de um composto a partir de um sistema polimérico. No entanto, a aplicação deste modelo cinético só é possível quando pelo menos 60% de liberação é observada.

De acordo com a literatura, o aumento observado na liberação está relacionado com diferentes porosidades nas formulações, o que significa que micropartículas mais porosas liberam o princípio ativo mais rapidamente (RIEKES *et al.*, 2011). Esta tendência só é observada da amostra MP9% para a mais concentrada MP40%. Na amostra MP19% ocorreu uma diminuição quando comparada com as demais o que pode estar relacionado à sua menor porosidade com relação às outras formulações.

5.5. AS MILIPARTÍCULAS DE ALGINATO DE CÁLCIO SEM OTIMIZAÇÃO (SOT) E OTIMIZADAS (OT)

As milipartículas de alginato de cálcio obtidas tanto sem o atraente floral *p*-DMB como contendo o mesmo, sem e com otimização, quando úmidas apresentaram-se macroscopicamente brancas, de morfologia esférica, superfície lisa e diâmetro maior quando comparadas com as partículas secas devido ao inchamento com água, como mostrado na FIGURA 67A.

Quando secas, em temperatura ambiente, mostraram aspecto amarelado, devido ao óleo de milho comercial incorporado, formato variável entre esférico e elipsóide, superfície lisa, aspecto rígido e menor diâmetro devido à perda de água durante o processo de secagem (FIGURA 67B). As amostras secas por meio da liofilização, por outro lado, apresentaram superfície rugosa e bastante porosa, não observado na FIGURA 67C mas visualizado a olho nú, pessoalmente.



FIGURA 67 – MILIPARTÍCULAS DE ALGINATO DE CÁLCIO, SEM E COM OTIMIZAÇÃO, ÚMIDAS (A), SECAS TEMPERATURA AMBIENTE (B) E SECAS POR LIOFILIZAÇÃO (C)

5.5.1. As misturas físicas (filmes) alginato de sódio/*p*-DMB (sem reticulação) com base nas formulações de milipartículas não otimizadas (sot)

As misturas físicas de alginato de sódio/*p*-DMB (sem reticulação) apresentaram-se homogêneas, finas, transparentes e oleosas devido à presença de óleo de milho. Mostraram baixa resistência ao rasgo quando comparado a filme reticulado devido à ausência de ligações cruzadas em sua estrutura.

5.5.2. Determinação do EHL das emulsões contendo óleo de milho comercial: descoberta da emulsão estável (ideal)

A definição de emulsão consiste em um sistema termodinamicamente instável resultante da mistura de dois líquidos imiscíveis (fases aquosa e oleosa) e uma terceira fase contendo um tensoativo ou par de emulsificantes (ZANIN *et al.*, 2002).

O par de tensoativo utilizado no preparo das emulsões, para descoberta da mais estável, foi o tensoativo Span 60 e o Tween 80 (FIGURA 68A e B). O monoestearato de sorbitano (Span 60), é um surfactante não iônico, utilizado na “solubilização” de óleos na água. De acordo com a literatura, o seu EHL é igual a 4,7, sendo considerado baixo e, portanto, pouco solúvel em água. O que significa que o número de mols de unidades de óxido de etileno presentes em sua estrutura de fórmula molecular $C_{24}H_{46}O_6$, é pequeno (American Pharmaceutical Association, 2006).

Enquanto que o Tween 80 (FIGURA 68B), conhecido como polissorbato 80, surfactante não iônico assim como o Span 60, possui um valor de EHL igual a 15, considerado alto e, por esse motivo, bastante solúvel em água. Apresenta fórmula molecular $C_{64}H_{124}O_{26}$ (American Pharmaceutical Association, 2006).

Ambos são bastante usados como estabilizantes em produtos alimentícios, farmacêuticos e cosméticos com grande possibilidade, portanto, de causarem pouca influência na aplicação em campo para controle populacional da praga *D. speciosa*.

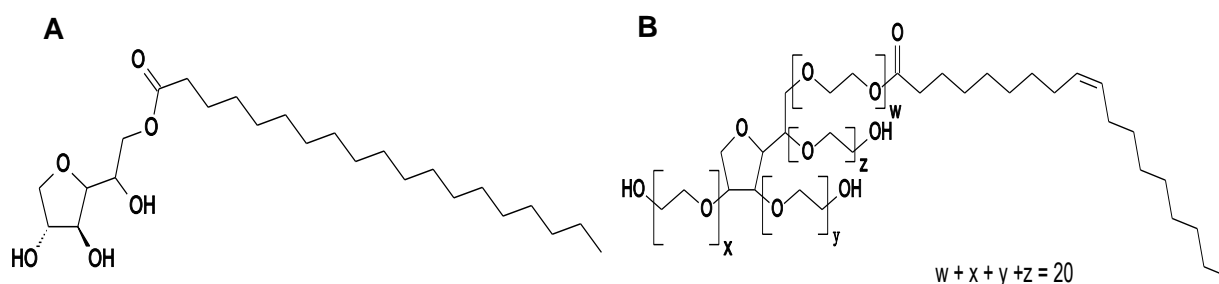


FIGURA 68: ESQUEMAS DAS FÓRMULAS ESTRUTURAIS DO PAR DE TENSOATIVOS USADOS NO PREPARO DAS EMULSÕES CONTENDO ÓLEO DE MILHO: A) SPAN 60 E B) TWEEN 80

As emulsões 1, 5 e 6 (TABELA 21) apresentaram-se estáveis após 24 horas em repouso, portanto, separação de fases não foi observada (FIGURA 69). As emulsões mais estáveis mostraram-se homogêneas, ausentes de grumos (não fibrosa), considerado este um resultado excelente de acordo com a avaliação organoléptica (aspecto físico) das formulações (ZANIN *et al.*, 2002). Os valores de EHL determinados para as emulsões 1, 5 e 6 foram de 9,85, 8,82 e 6,76, respectivamente (TABELA 21). De acordo com a literatura, valores de equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) em torno de 6,76 e/ou 7,79 são considerados excelentes para óleos (ZANIN *et al.*, 2002).

TABELA 21 - EMULSÕES PREPARADAS COM ÓLEO DE MILHO EM UMA CONCENTRAÇÃO CONSTANTE COM SPAN 60 E TWEEN 80 EM PROPORÇÕES VARIÁVEIS, RESULTADOS OBSERVADOS APÓS 24 HORAS DE PREPARO E VALORES DE EHL DETERMINADOS PARA CADA EMULSÃO FORMULADA

| Emulsão | Span 60 (g) | Tween 80 (g) | Observação após 24 horas | Aspecto | Resultado | EHL |
|---------|-------------|--------------|--------------------------|-------------|-----------|-------|
| 1 | 0,5 | 0,5 | Estável | Homogêneo | Excelente | 9,85 |
| 2 | 0,2 | 0,8 | Instável | Heterogêneo | Ruim | 12,94 |
| 3 | 0,4 | 0,6 | Instável | Heterogêneo | Ruim | 10,88 |
| 4 | 0,0 | 1,0 | Instável | Heterogêneo | Ruim | 15,0 |
| 5 | 0,6 | 0,4 | Estável | Homogêneo | Excelente | 8,82 |
| 6 | 0,8 | 0,2 | Estável | Homogêneo | Excelente | 6,76 |



FIGURA 69 – FOTO DAS EMULSÕES ESTÁVEIS (SEM SEPARAÇÃO DE FASES)

As de número 2, 3 e 4 (TABELA 21) apresentaram separação de fases: oleosa e aquosa, como pode ser observado na FIGURA 70. De acordo com a literatura, este resultado é considerado ruim, com valores de EHL calculados de 12,94, 10,88, 15,0 para as emulsões 2, 3 e 4 respectivamente (ZANIN *et al.*, 2002) (TABELA 21).

Com a finalidade de estender a durabilidade das emulsões preparadas, os conservantes Nipagin (FIGURA 71A), conservante hidrossolúvel, (4-hidroxibenzoato de metila ou metilparabeno) e Nipazol (FIGURA 71B), conservante lipossolúvel, (4-hidroxibenzoato de propila ou propilparabeno) foram adicionados.

Portanto, as emulsões de número 1, 5 e 6 com maior estabilidade nos estudos de EHL, acrescida dos tensoativos utilizados em seus preparos, foram submetidas aos estudos preliminares de estabilidade a curto prazo e posterior avaliação organoléptica (aspecto físico da emulsão).



FIGURA 70 – FOTO DAS EMULSÕES INSTÁVEIS (COM SEPARAÇÃO DE FASES)



FIGURA 71 – REPRESENTAÇÃO DAS FÓRMULAS ESTRUTURAIS DOS CONSERVANTES UTILIZADOS NAS EMULSÕES: A) NIPAGIN E B) NIPAZOL

5.5.3. Testes de estabilidade acelerados a curto prazo e avaliação organoléptica das emulsões estáveis

De acordo com a Farmacopéia Americana (USP, 1990) a estabilidade de uma emulsão pode ser definida como a amplitude na qual um produto mantém dentro de limites especificados, as mesmas propriedades físico-químicas que possuía no momento de sua produção, armazenamento e posterior uso.

A falta de estabilidade de uma emulsão pode ser manifestada de diversas formas, entre elas têm-se: cremosidade, relativa às características macio e fino, floculação e coalescência, relacionado à homogeneidade. Conforme as emulsões vão ficando instáveis, suas propriedades físico-químicas como o pH, viscosidade, densidade, condutividade elétrica, umidade, tamanho de partículas (gotículas), entre outros são alteradas (ANVISA, 2004).

As emulsões 1 e 5 (TABELA 21) apresentaram separação de fases aquosa e oleosa com presença significativa de grumos. Estas alterações observadas quanto às suas características (TABELA 22, 23 e 24) são consideradas alterações sérias e não aceitáveis, como relatado na literatura (ZANIN *et al.*, 2002).

As emulsões 1, 5 e 6 colocadas em estufa a $50^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e em centrífuga a 3500 rpm por 30 minutos à temperatura ambiente, tiveram seus pHs medidos antes (5,0) e depois (5,0) da realização destes testes. A manutenção dos valores de pH sugere que a estabilidade química não foi alterada após o preparo de todas as formulações estáveis.

Por outro lado, a emulsão 6 foi considerada a mais estável dentre as preparadas, já que quando submetidas às condições de estresse supracitadas não apresentaram alterações em suas características organolépticas e mantiveram propriedades ideais como homogeneidade, brilho, macio, fino e opacidade do tipo opalescente. Este é um indicativo de estabilidade do sistema, de acordo com a literatura (GENNARO, 2004).

TABELA 22 - EMBALAGEM DE VIDRO – AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ORGANOLÉPTICAS (ASPECTO) DAS EMULSÕES 1 E 5 SOB ESTRESSE (ESTUFA A $50^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$)

| Características avaliadas | Período de 72 horas |
|----------------------------------|----------------------------|
| Homogeneidade | Heterogêneo |
| Brilho | Opaco |
| Macio | Fibroso |
| Fino | Grosso |
| Opacidade | Opalescente |

TABELA 23 - EMBALAGEM DE VIDRO – AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ORGANOLÉPTICAS (ASPECTO) DAS EMULSÕES SOB ESTRESSE 1 E 5 (GELADEIRA A $-5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$)

| Características avaliadas | Período de 72 horas |
|----------------------------------|----------------------------|
| Homogeneidade | Heterogênea |
| Brilho | Brilhante |
| Macio | Macio |
| Fino | Fino |
| Opacidade | Opaco |

TABELA 24 - AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ORGANOLÉPTICAS (ASPECTO) DAS EMULSÕES 1 E 5 SOB ESTRESSE (CENTRÍFUGA A 3500 rpm DURANTE 30 MINUTOS À TEMPERATURA AMBIENTE)

| Características avaliadas | 30 minutos |
|----------------------------------|-------------------|
| Homogeneidade | Heterogêneo |
| Brilho | Brilhante |
| Macio | Fibroso |
| Fino | Fino |
| Opacidade | Opaco |

5.5.4. Avaliação das emulsões estáveis por meio de microscopia ótica

As emulsões mais estáveis entre todas as amostras preparadas, 1, 5 e 6 (TABELA 21), foram avaliadas por meio da microscopia ótica para observação e confirmação da estabilidade das emulsões após 24 horas de suas preparações. As emulsões foram fotografadas e os resultados são mostrados nas FIGURA 72, 73 e 74. As imagens revelaram gotículas de óleo de milho bem formadas e definidas, em geral, homogêneas.

A grande presença de gotículas de óleo de milho menores em meio às maiores nas fotos das emulsões 1 e 5 (FIGURA 72 e 73), em menor quantidade, torna possível a ocorrência de agregação das menores com as maiores, desta forma, desestabilizando o sistema de maneira mais rápida.

O contrário é observado para a emulsão estável de número 6, considerada a de maior estabilidade, já que a presença de glóbulos de óleo de diâmetros menores estão em quantidade reduzida o que dificulta a agregação com as gotículas oleosas maiores (FIGURA 74).

A presença de glóbulos de óleo mais homogêneos em diâmetro é um sinal visível de estabilidade das emulsões preparadas (FIGURA 72, 73 e 74).

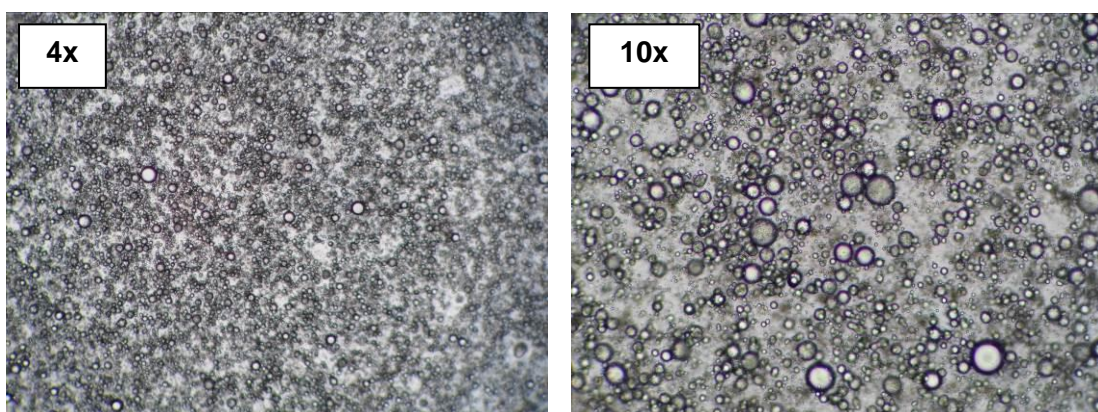


FIGURA 72 – FOTO TIRADA DA EMULSÃO ESTÁVEL DE NÚMERO 1, APÓS 24 HORAS DO PREPARO, CONTENDO 0,5g DE SPAN 60 E 0,5g DE TWEEN 80, EM AUMENTOS DE 4X E 10X

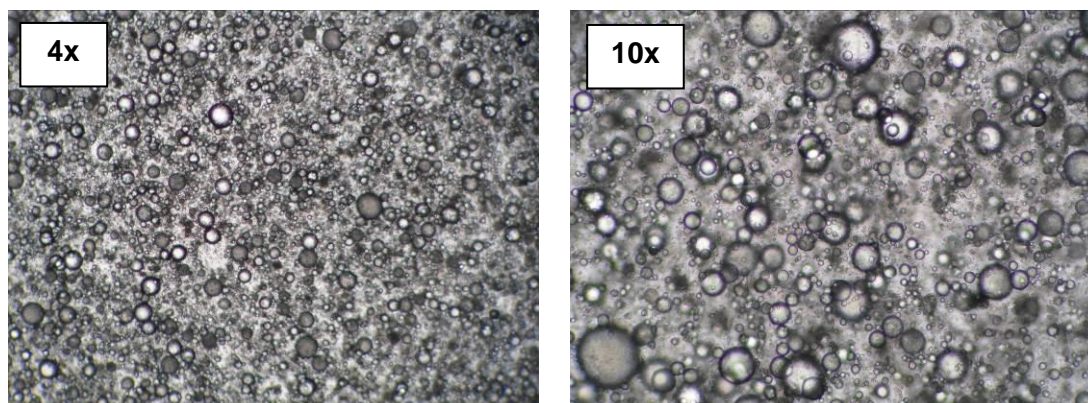


FIGURA 73 – FOTO, OBTIDA POR MICROSCOPIA ÓTICA, DA EMULSÃO ESTÁVEL DE NÚMERO 5, APÓS 24 HORAS DO PREPARO, CONTENDO 0,6g DE SPAN 60 E 0,4g DE TWEEN 80, EM AUMENTOS DE 4X E 10X

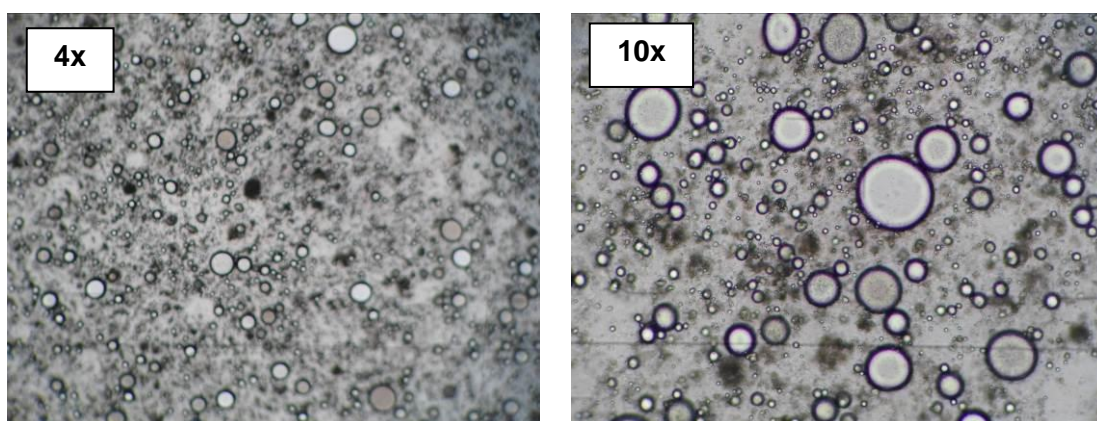


FIGURA 74 – FOTO, OBTIDA POR MICROSCOPIA ÓTICA, DA EMULSÃO ESTÁVEL DE NÚMERO 6, APÓS 24 HORAS DO PREPARO, CONTENDO 0,8g DE SPAN 60 E 0,2g DE TWEEN 80, EM AUMENTOS DE 4X E 10X

5.5.5. Avaliação da estabilidade das emulsões para preparo das milipartículas de alginato de cálcio não otimizadas por microscopia ótica

Pela FIGURA 75 pode ser visto que a emulsão formada com um único tensoativo, o Tween 80, apresentou-se estável após 24 horas, devido à homogeneidade dos tamanhos das gotículas de óleo de milho observadas, o que dificulta a coalescência (agregação) das mesmas.

Sabe-se que em emulsões preparadas com solução aquosa de alginato de sódio quanto menor o tamanho das gotículas de óleo dispersas na fase aquosa, maior é a retenção das mesmas no interior das partículas de alginato de cálcio

formadas, que diretamente será responsável por um aumento na eficiência de encapsulação (EE%). Além disso, as gotículas não apresentaram coalescência à presença de gotículas oleosas de diâmetros menores (uniformidade de tamanho) (CHAN, 2011). As emulsões deste trabalho foram preparadas no intervalo de concentrações determinados estáveis por Chan (2011), ou seja, 25 g.L⁻¹ da solução de alginato de sódio e a concentração de óleo de milho foi de 5% (V/V).

Chan (2011) também observou que, quanto maior a concentração da solução de alginato de sódio, menores são os tamanhos das gotículas de óleo observadas nas emulsões preparadas com esta solução. Em seu estudo, portanto, as emulsões estáveis são as que apresentaram concentração de alginato de sódio superior a 25 g.L⁻¹ e concentração de óleo até 40 % (V/V).

A literatura ainda relata que, com o aumento da concentração de hidrocolóides como o alginato de sódio, ocorre um aumento na estabilidade das emulsões. Isto acontece porque o aumento na viscosidade da fase contínua ao redor das gotículas de óleo dispersas restringe o movimento delas ou a adsorção/precipitação do hidrocolóide na interface óleo-água, causando uma diminuição na tensão interfacial. Portanto, as emulsões formadas com o tensoativo Tween 80, foram estáveis, quando avaliadas após 24 horas por microscopia ótica (FIGURA 75).

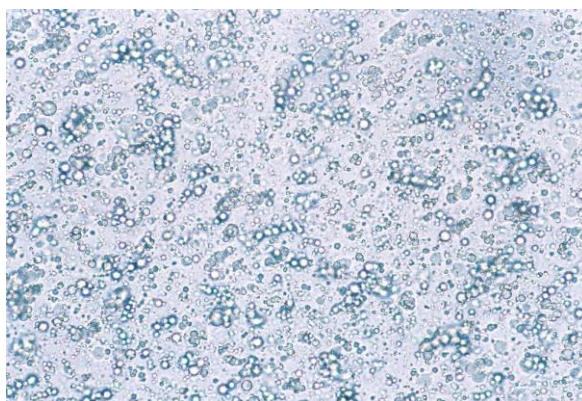


FIGURA 75 – FOTO, OBTIDA POR MICROSCOPIA ÓTICA, DA EMULSÃO PREPARADA SOMENTE COM 1% (m/V) DE TWEEN 80 SOLUBILIZADO NA SOLUÇÃO AQUOSA DE ALGINATO DE SÓDIO TENSOATIVO TWEEN 80, APÓS 24 HORAS DO PREPARO, EM AUMENTO DE 4X

Transcorridos 72 horas do preparo das emulsões, elas não apresentaram a mesma estabilidade. A separação de fases mostrou-se evidente (FIGURA 76).



FIGURA 76 – EMULSÃO INSTÁVEL: SEPARAÇÃO DE FASES OLEOSA E AQUOSA

Assim pela descoberta da emulsão mais estável, com base nas proporções de tensoativos utilizados, foi possível preparar amostras de milipartículas de alginato de cálcio, como forma, de melhorar a retenção das gotículas de óleo contendo o *p*-DMB na matriz polimérica.

5.6. CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PARTÍCULAS DE ALGINATO

5.6.1. Espectroscopia no infravermelho das amostras de partículas de alginato

A interação entre o atraente floral *p*-DMB e o polímero alginato de sódio foi investigada por meio da espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier. Os espectros do alginato de sódio puro, das milipartículas sem o atraente floral, das milipartículas contendo o mesmo, do óleo de milho comercial, utilizado no preparo das formulações, das misturas físicas alginato de sódio/*p*-DMB e do atraente floral puro são mostrados na FIGURA 77.

O alginato de sódio puro apresentou bandas características em 3386 cm^{-1} referente à deformação axial simétrica de hidroxilas, 2905 cm^{-1} referente à

deformação axial simétrica de C-H, 1091 cm^{-1} referente à deformação axial de C-O de ésteres e deformação axial de grupamentos carboxilato em 1625 cm^{-1} .

Pela FIGURA 77 é possível observar um deslocamento discreto para 1628cm^{-1} na banda referente aos grupamentos carboxilato (1625cm^{-1}) nas milipartículas sem e contendo o atraente floral quando comparado com o alginato de sódio puro. De acordo com a literatura essa mudança de número de onda é atribuída à formação da ligação cruzada dos grupamentos carboxilato com o íon Ca^{2+} (ALIPUOR *et al.*, 2010).

A banda de hidroxila (3386cm^{-1}) observada para as milipartículas de alginato de cálcio contendo o *p*-DMB e sem o mesmo, podem sofrer deslocamento para um número de onda maior que a do alginato de sódio puro, conforme já foi citado na literatura por Alipuur e colaboradores (2010). Esta alteração é causada, provavelmente, devido a um efeito negativo na formação de ligações hidrogênio envolvendo grupos hidroxilas adjacentes como resultado da mudança de conformação do polissacarídeo alginato depois de reagir com os íons Ca^{2+} .

No espectro no infravermelho para o *p*-DMB puro (FIGURA 77) bandas características do composto são mostradas como já relatado na seção 5.2.1.

Para o espectro apresentado para o óleo de milho comercial foram observadas bandas como a deformação axial simétrica em que as ligações de CH_3 se estendem e contraem em fase em 2927cm^{-1} , a deformação axial simétrica de CH_2 em 2856 cm^{-1} , a deformação axial de C=O de ésteres alifáticos saturados em 1749cm^{-1} , a deformação angular assimétrica de C-H em 1451cm^{-1} , a deformação correspondente aos C-O-C de ésteres saturados entre 1210cm^{-1} e 1160cm^{-1} (SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

A incorporação do *p*-DMB no interior das milipartículas de alginato de sódio não foi conclusiva por meio da avaliação do espectro das milipartículas carregadas porque a intensidade e a resolução dos picos observados não são possíveis de serem discernidos devido à interferência causada pelo óleo de milho, utilizado no preparo das formulações. Entretanto, a mistura física preparada somente entre o atraente floral e o polímero mostrou bandas de absorção típicas do *p*-DMB como mostrado na FIGURA 77. Esta observação sugere que o atraente floral e o polímero interagem fisicamente entre si como já relatado na literatura para outros princípios ativos (MLADENOVSKA *et al.*, 2007).

Portanto como forma confirmar a presença do atraente floral *p*-DMB, a ferramenta quimiométrica conhecida como análise de componentes principais foi aplicada, assim como feito para as micropartículas de PHBV.

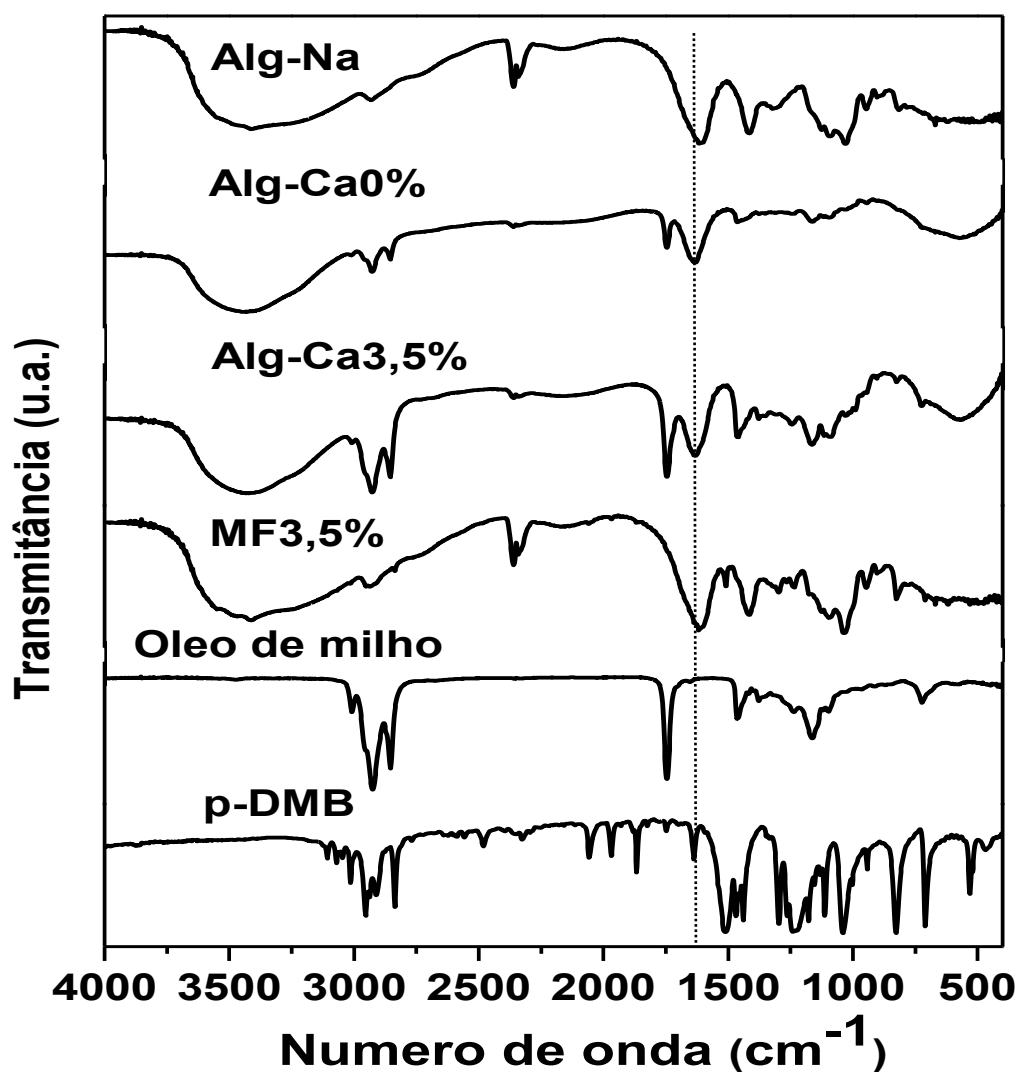


FIGURA 77 – ESPECTROS NO INFRAVERMELHO DO ALGINATO DE SÓDIO (ALG-NA), DO ATRAENTE FLORAL *p*-DMB, ÓLEO DE MILHO COMERCIAL, MISTURA FÍSICA ALGINATO DE SÓDIO/*p*-DMB (MF3,5%) E MILIPARTÍCULAS DE ALGINATO DE CÁLCIO SEM (ALG-CA 0%) E COM O ATRAENTE FLORAL (ALG-CA 3,5%)

5.6.2. Análise de componentes principais (PCA) aplicada aos espectros no infravermelho das amostras de alginato

A análise de componentes principais foi aplicada aos espectros no infravermelho para todas as amostras avaliadas o que inclui o atraente floral *p*-DMB, o alginato de sódio puro, o óleo de milho comercial e as três formulações de milipartículas feitas com quantidades diferentes e crescentes de atraente floral (MP1,5%,MP2,5% e MP3,5%). Todas as amostras foram avaliadas em triplicata, obtendo-se um total de 18 espectros. Uma matriz com os dados espectrais foi tratada, sendo obtido um sistema com duas componentes principais (principal components) designadas como PC1 e PC2, que explicam 97,22% da variância dos dados originais.

Os dados originais (os espectros) foram previamente pré-processados por autoescalamento e centrados na média.

Pelo o gráfico de scores (FIGURA 78) é possível observar que a primeira componente principal (PC1), explica 76,72% da variância dos dados, enquanto que a segunda componente principal (PC2). Por meio deste gráfico foi constatado que as amostras do atraente floral *p*-DMB (1,2 e 3), de óleo de milho (4,5 e 6), de alginato de sódio puro (Alg-Na) (7,8 e 9), e das milipartículas de alginato de cálcio (10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18) foram separadas dentro de seus respectivos grupos (TABELA 25).

As amostras de milipartículas de alginato de cálcio não foram claramente separadas entre si, o que sugere que a diferença entre as concentrações de *p*-DMB é muito pequenas para que tal separação se torne evidente.

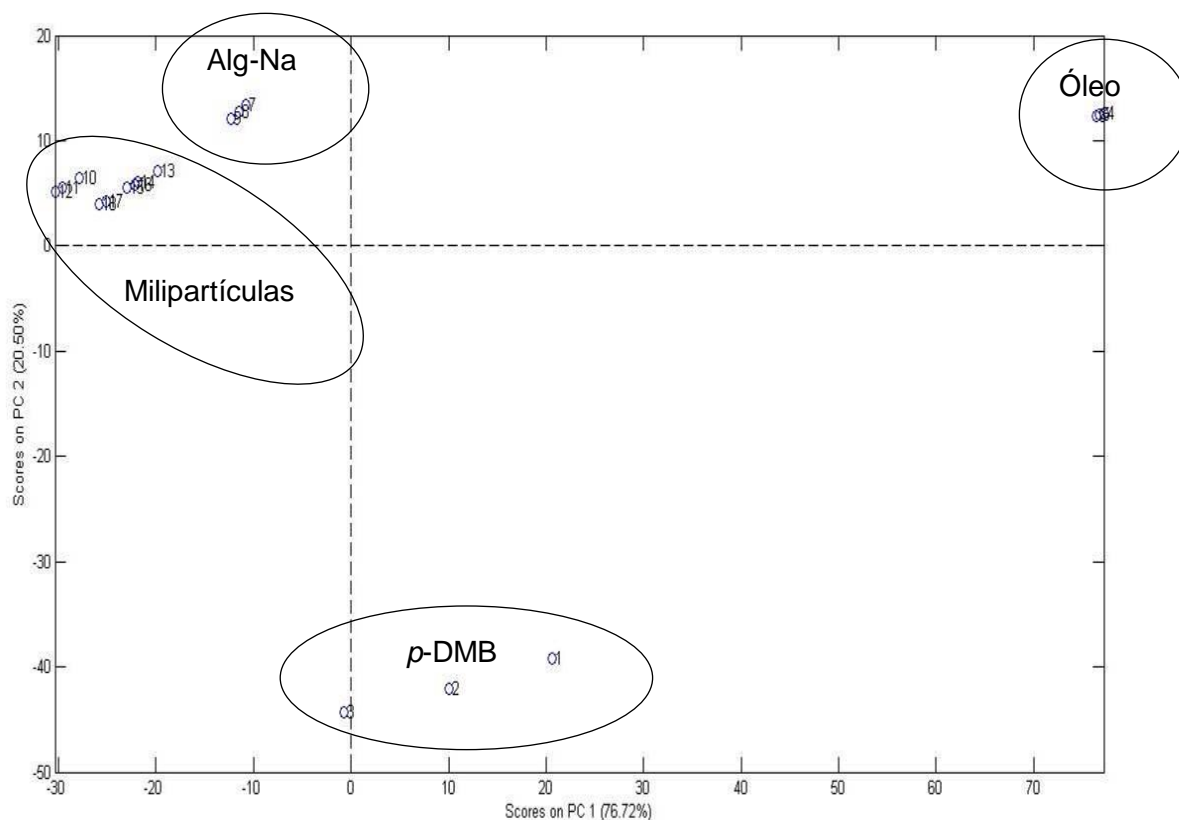


FIGURA 78 - GRÁFICO DE SCORES PARA O *p*-DMB, ALGINATO DE SÓDIO, ÓLEO DE MILHO E MILIPARTÍCULAS CONTENDO O ATRAENTE FLORAL (MP1,5%, MP2,5% E MP3,5%)

TABELA 25 – AMOSTRAS AVALLIADAS PELA FERRAMENTA QUIMIOMÉTRICA DE ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS: ATRAENTE FLORAL PURO (*p*-DMB), ÓLEO DE MILHO, ALGINATO DE SÓDIO PURO (Alg-Na) E MILIPARTÍCULAS DE ALGINATO DE CÁLCIO CONTENDO O ATRAENTE FLORAL EM QUANTIDADES DIFERENTES E CRESCENTES

| Amostras | Numeração |
|---------------------------------|-----------|
| <i>p</i> -DMB | 1,2,3 |
| Óleo de milho | 4,5,6 |
| Alginato de sódio puro (Alg-Na) | 7,8,9 |
| Alg-Ca1,5% | 10,11,12 |
| Alg-Ca2,5% | 13,14,15 |
| Alg-Ca3,5% | 16,17,18 |

Pelos gráficos de loadings da PC1 e PC2 (FIGURA 79 e 80, respectivamente), foi possível interrelacionar as variáveis estudadas. A componente principal 1 (PC1) é responsável por explicar a diferença nas amostras de acordo com a presença de

óleo de milho, mas principalmente com a presença do atraente floral *p*-DMB.

Por outro lado a componente principal 2 (PC2) foi responsável pela presença do polímero alginato e do óleo de milho utilizado no preparo das formulações.

Para a PC1 (FIGURA 79) tem-se, como variáveis importantes, as linhas 449 e 450 que correspondem à banda em 1253 e 1255cm^{-1} , característico de deformação axial assimétrica de C-O-C de éter. As linhas 577 e 578, que correspondem à banda em 1500 e 1502cm^{-1} , referentes à deformação axial das ligações C=C do anel aromático do *p*-DMB. A linha 700 corresponde à banda em 1737cm^{-1} referente à absorção de carbonila de ésteres alifáticos saturados. As linhas 1271 e 1312 correspondem às bandas em 2839 e 2918cm^{-1} , respectivamente, correspondentes à deformação axial de C-H de metila.

Por outro lado, no gráfico de loadings para PC2 (FIGURA 80), podem ser destacadas as variáveis importantes, correspondentes às linhas 642, 693, e 1279, referentes às bandas em 1625cm^{-1} , 1724cm^{-1} e 2854cm^{-1} , respectivamente, que correspondem à deformação axial de grupamentos carboxilatos, deformação de C=O de ácidos e deformação axial de CH₂ (metileno), respectivamente.

Logo, a PC1 faz o reconhecimento de padrões de acordo com o óleo de milho e o atraente floral *p*-DMB, nas formulações e a PC2 faz uma análise exploratória dos dados com relação ao polímero alginato. É possível dizer que tanto o polímero como o atraente floral como o óleo de milho comercial estão presentes nas formulações. Portanto, o *p*-DMB foi encapsulado.

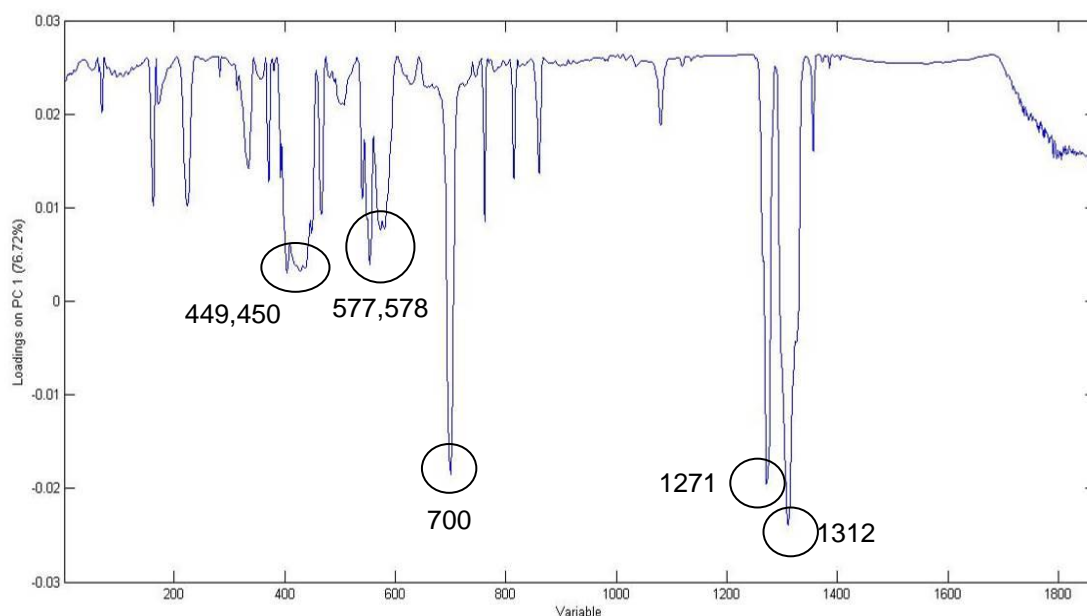


FIGURA 79 - GRÁFICO DE LOADINGS PARA COMPONENTE PRINCIPAL UM (PC1) QUE REPRESENTA AS BANDAS SIGNIFICATIVAS PARA O ÓLEO DE MILHO COMERCIAL E PARA O ATRAENTE FLORAL *p*-DMB

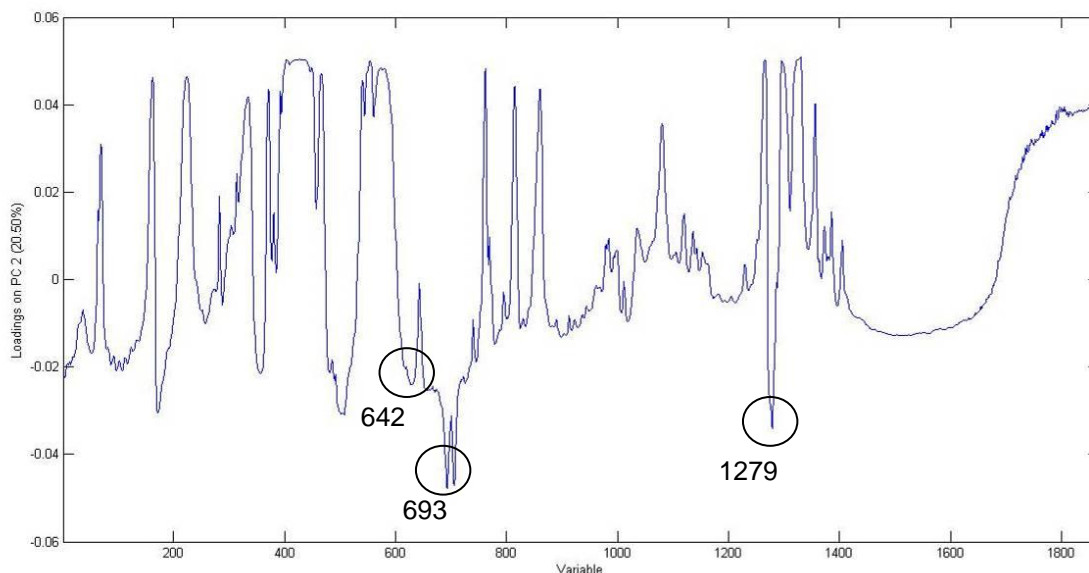


FIGURA 80 - GRÁFICO DE LOADINGS PARA COMPONENTE PRINCIPAL DOIS (PC2) QUE REPRESENTA AS BANDAS SIGNIFICATIVAS PARA O POLÍMERO ALGINATO

5.6.3. Difração de raios-X (DRX) para as amostras contendo alginato

Pela análise por difração de raios-X foi possível avaliar o estado de dispersão do atraente floral *p*-DMB na matriz polimérica bem como a cristalinidade das formulações preparadas. A FIGURA 81 mostra os difratogramas de raios-X obtidos. A inspeção da FIGURA 81 revela que as amostras de alginato de sódio, de micropartículas de alginato de cálcio sem e com o atraente floral apresentaram perfil similares, com características amorfas nos difratogramas, já que não há a presença de picos significativos indicativos de cristalinidade. Sabe-se que o polissacarídeo alginato de sódio é um polímero amorfo, portanto pela avaliação das micropartículas sem o ativo e contendo o mesmo é válido dizer que seu estado amorfo não foi alterado. A presença destes halos amorfos foi observada por Alipour e colaboradores (2010) em estudo de encapsulação do fármaco paclitaxel em micropartículas de alginato.

Na realidade o próprio óleo de milho comercial presente no preparo das formulações contribuiu para manutenção da característica natural do alginato de sódio.

Por meio da avaliação dos difratogramas obtidos para o *p*-DMB antes e após passar por processo de ressolubilização foi observado que o atraente floral teve seu arranjo cristalino modificado, evidenciado pelo desaparecimento de alguns picos indicativos de cristalinidade.

Logo, os difratogramas das milipartículas de alginato de cálcio contendo o atraente floral fornece a evidência de que o *p*-DMB teve seu arranjo estrutural modificado durante o preparo das formulações. As amostras de milipartículas de alginato de cálcio otimizadas apresentaram o mesmo perfil apresentado para as não otimizadas (FIGURA 81).

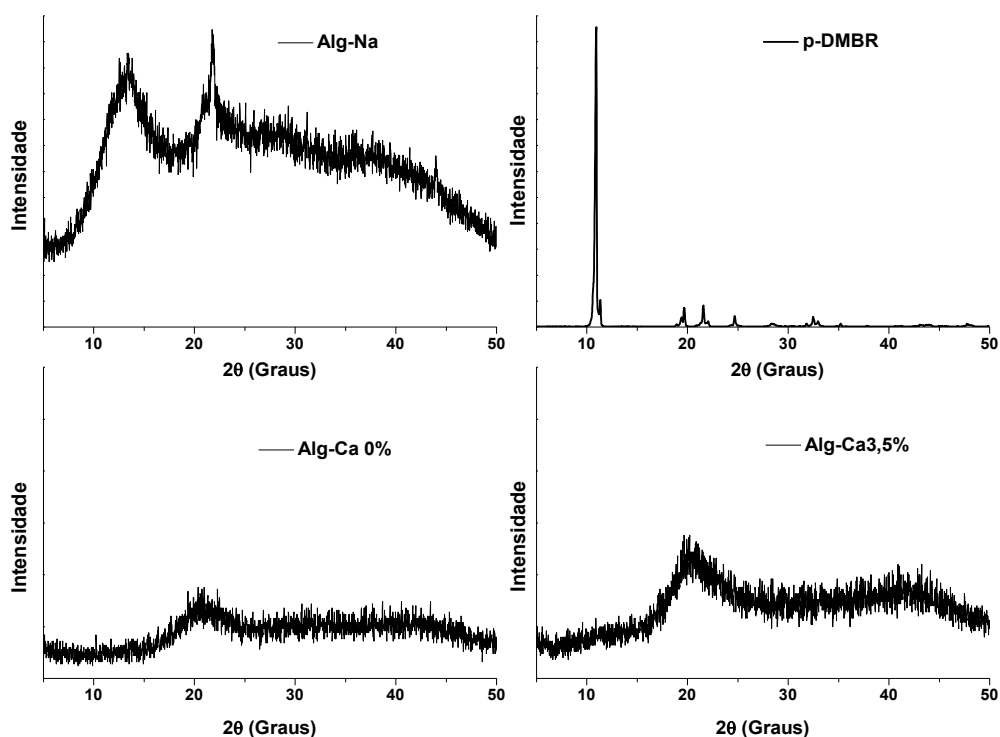


FIGURA 81 – DIFRATOGRAMAS DO ALGINATO DE SÓDIO PURO (ALG-NA), *p*-DIMETOXIBENZENO PURO RESSOLUBILIZADO (*p*-DMBR) E MILIPARTÍCULAS DE CÁLCIO SEM (ALG-CA0%) E COM O ATRAENTE FLORAL (ALG-CA3,5%)

Os difratogramas obtidos para as misturas físicas (FIGURA 82) mostraram que, por não terem sido reticuladas com cloreto de cálcio, não apresentaram o mesmo perfil observado para as amostras de milipartículas de alginato de cálcio, formuladas

sem e com o atraente floral *p*-DMB. Foi observado um halo amorfo bastante intenso em $2\theta = 20^\circ$ comportamento este similar ao observado para o alginato de sódio puro, amorfo. O óleo de milho, material também amorfo, contribuiu para a manutenção das características amorfas do polímero.

Embora não tenham sido observado picos indicativos de cristalinidade nos difratogramas das milipartículas de alginato de cálcio e das misturas físicas contendo o atraente floral, que representaria a presença de *p*-DMB de estrutura cristalina, o difratograma da mistura física contendo 3,5% (m/V) de *p*-DMB mostrou perfil diferente da mistura física sem o composto (MF0%), indicativo da presença de atraente floral no sistema. A ausência de pico cristalino também é possível e pode ser explicada pela dissolução do *p*-DMB na fase oleosa. (FIGURA 82).

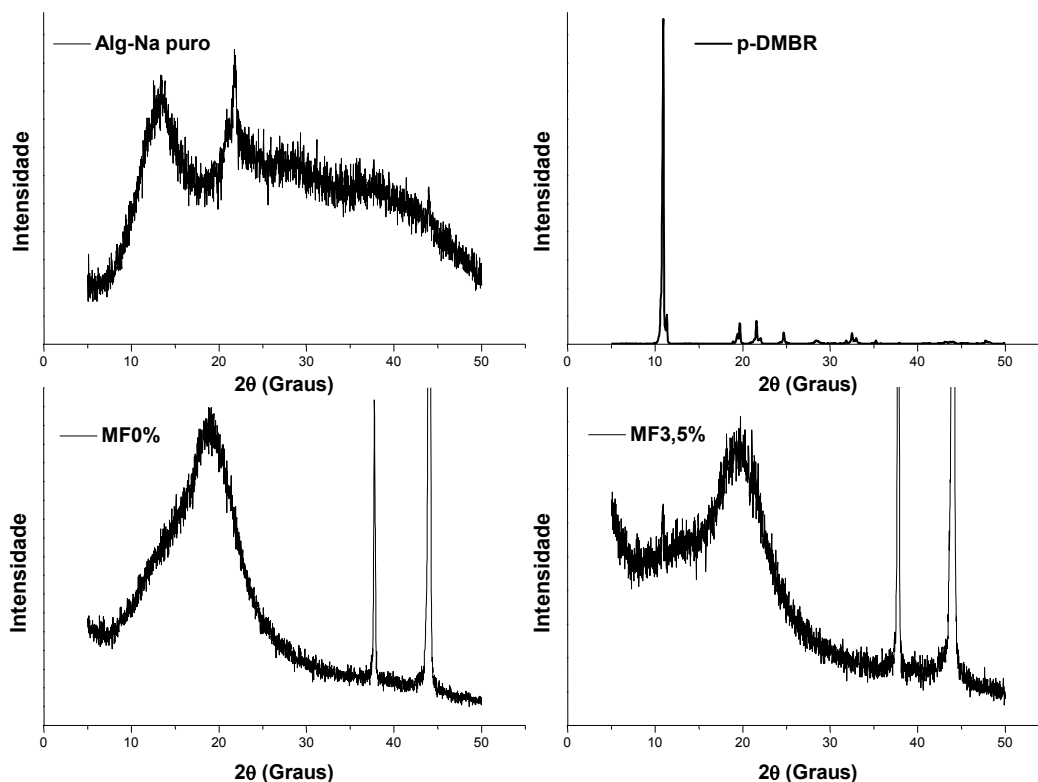


FIGURA 82 – DIFRATOGRAMAS DO ALGINATO DE SÓDIO PURO (ALG-NA), *p*-DIMETOXIBENZENO PURO RESSOLUBILIZADO (*p*-DMBR) E MISTURAS FÍSICAS DE ALGINATO DE SÓDIO SEM (MF0%) E COM O ATRAENTE FLORAL (MF3,5%)

5.6.4. Calorimetria exploratória diferencial (DSC) das formulações de alginato

Mediante a inspeção das curvas de calorimetria exploratória diferencial para o alginato de sódio puro, para as milipartículas de alginato de cálcio sem o atraente floral (Alg-Ca0%) e para as contendo o *p*-DMB (Alg-Ca1,5; 2,5 e 3,5%) sem e com otimização, foram obtidos os valores de temperatura de transição vítrea (T_g) e degradação (T_d) das amostras avaliadas (TABELA 26).

Pela avaliação das temperaturas de transição vítrea (T_g) para todas as amostras analisadas, foi observado um aumento nos valores de T_g . Este acréscimo para as milipartículas de alginato de cálcio sem atraente floral (Alg-Ca0%), comparado com a amostra de alginato puro, é relativo à formação das ligações cruzadas (reticulação). Por outro lado, o aumento de T_g evidenciado para as formulações contendo o atraente floral sugere que há *p*-DMB incorporado na matriz polimérica.

Os aumentos nas temperaturas de degradação (T_d) mostrados na TABELA 26, demonstram que, de certa forma, o *p*-DMB pode estar presente na matriz polimérica. Considerando que foi observado uma variação nas temperaturas de transição vítrea e de degradação, sugere-se que ocorreu a encapsulação do atraente floral.

Pela avaliação das curvas de DSC (terceira rampa de aquecimento) (FIGURA 83) não foi observado evento endotérmico referente à fusão do *p*-DMB, nas amostras de milipartículas de alginato de cálcio estudadas. Isto ocorre porque o atraente floral e o polímero interagem favoravelmente (miscibilidade) estando, desta forma, o *p*-DMB disperso na matriz polimérica. Esta consideração pode ser relevante para os estudos de liberação *in vitro* (XIE *et al.*, 2008).

TABELA 26 – DADOS DE TEMPERATURA DE TRANSIÇÃO VÍTREA (T_g) E DE TEMPERATURA DE DEGRADAÇÃO (T_d) PARA AS AMOSTRAS DE MILIPARTÍCULAS DE ALGINATO DE CÁLCIO NÃO OTIMIZADAS

| Amostras | T_g (°C) | T_d (°C)** |
|------------------------------|------------|--------------|
| Alg-Na* | 160 | 250 |
| Milipartículas Alg-Ca (0%) | 228 | 274 |
| Milipartículas Alg-Ca (1,5%) | 228 | 305 |
| Milipartículas Alg-Ca (2,5%) | 246 | 299 |
| Milipartículas Alg-Ca (3,5%) | 227 | 305 |

*CURVA DE DSC NÃO MOSTRADA

**TEMPERATURA DE DEGRADAÇÃO DAS AMOSTRAS

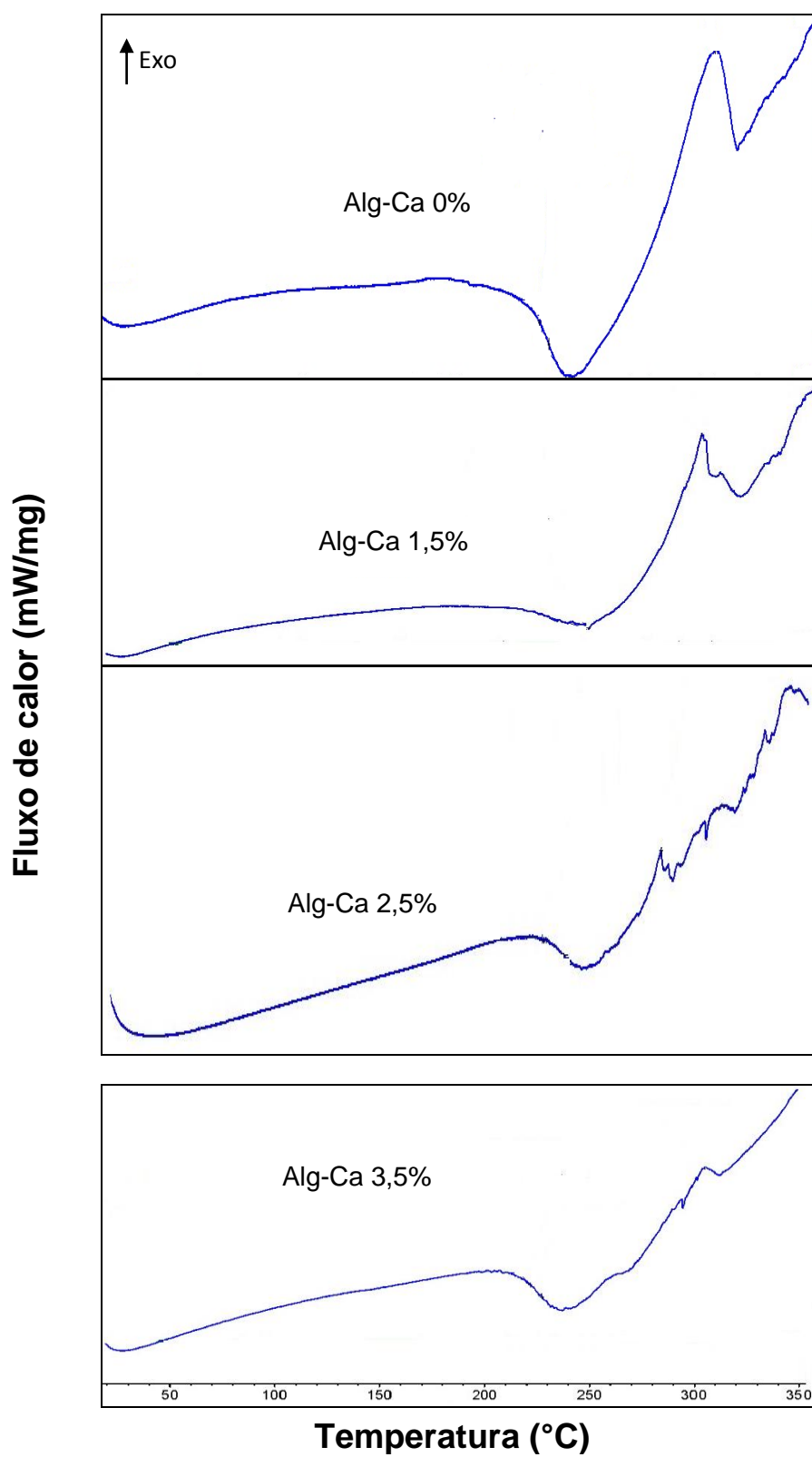


FIGURA 83 – CURVAS DE DSC PARA AS MILIPARTÍCULAS DE ALGINATO DE CÁLCIO SEM OTIMIZAÇÃO DESIGNADAS COMO ALG-CA0% (SEM ATRAENTE FLORAL), ALG-CA1,5, 2,5 E 3,5% (COM *p*-DMB)

Para as amostras de milipartículas de alginato de cálcio otimizadas, o perfil das curvas de DSC foi similar aos obtidos para as amostras não otimizadas (FIGURA 83). Não foi possível, para essas amostras, determinar a temperatura de transição vítrea (T_g), o que pode ter sido influência da presença do tensoativo Span 60 nas formulações.

Mas ao observar a curva de DSC, referente à primeira rampa de aquecimento, para a amostra de milipartículas de alginato de cálcio contendo 1,5% (m/V de óleo de milho), foi possível detectar a presença de um evento endotérmico referente à fusão do atraente floral em 61°C, aproximadamente (FIGURA 84). Para as demais formulações a fusão do *p*-DMB não foi observada devido à umidade das amostras, detectada pela presença de um evento endotérmico, relacionado à perda de água em 100°C, aproximadamente que provavelmente sobrepõe a fusão do composto.

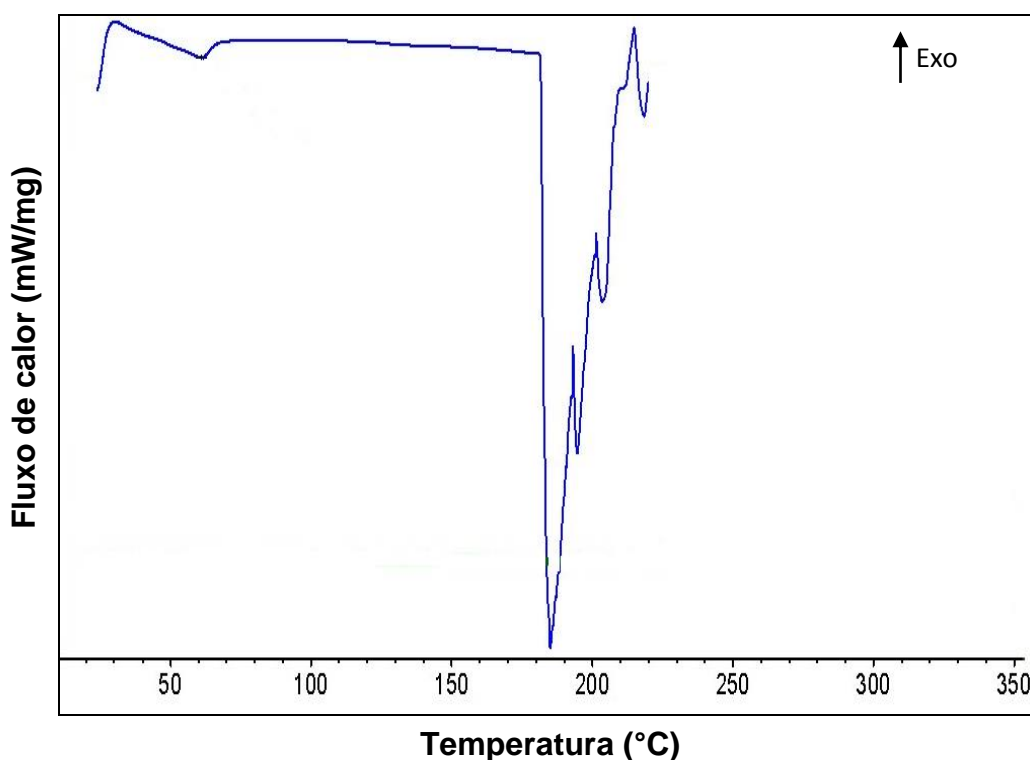


FIGURA 84 – CURVA DE DSC PARA AS MILIPARTÍCULAS DE ALGINATO DE CÁLCIO COM OTIMIZAÇÃO DESIGNADAS COMO ALG-CA1,5%, REFERENTE À PRIMEIRA RAMPA DE AQUECIMENTO

Pelas análises de DSC avaliadas, não é possível confirmar a encapsulação do atraente floral mas que o processo de reticulação alterou significativamente as temperaturas de degradação das milipartículas sem e com o *p*-DMB quando comparadas com a do polímero puro.

5.6.5. Análise termogravimétrica (TGA) das amostras de alginato

As curvas de análise termogravimétrica para o alginato de sódio puro, o *p*-DMB, óleo de milho comercial e milipartículas de alginato de cálcio, não otimizadas, sem e com o atraente floral designadas como Alg-Ca (1,5% m/V), Alg-Ca (2,5% m/V) e Alg-Ca (3,5% m/V) são mostradas na FIGURA 85. As amostras otimizadas de milipartículas de alginato de cálcio (Alg-Ca1,5 e 2,5% m/V) são mostradas na FIGURA 86. As amostras sem e com otimização apresentaram perfil semelhantes com relação as curvas de TGA e, por consequência, a presença do Span 60 não alterou significativamente a estabilidade térmicas das milipartículas de alginato de cálcio quando comparadas com as sem o tensoativo em questão.

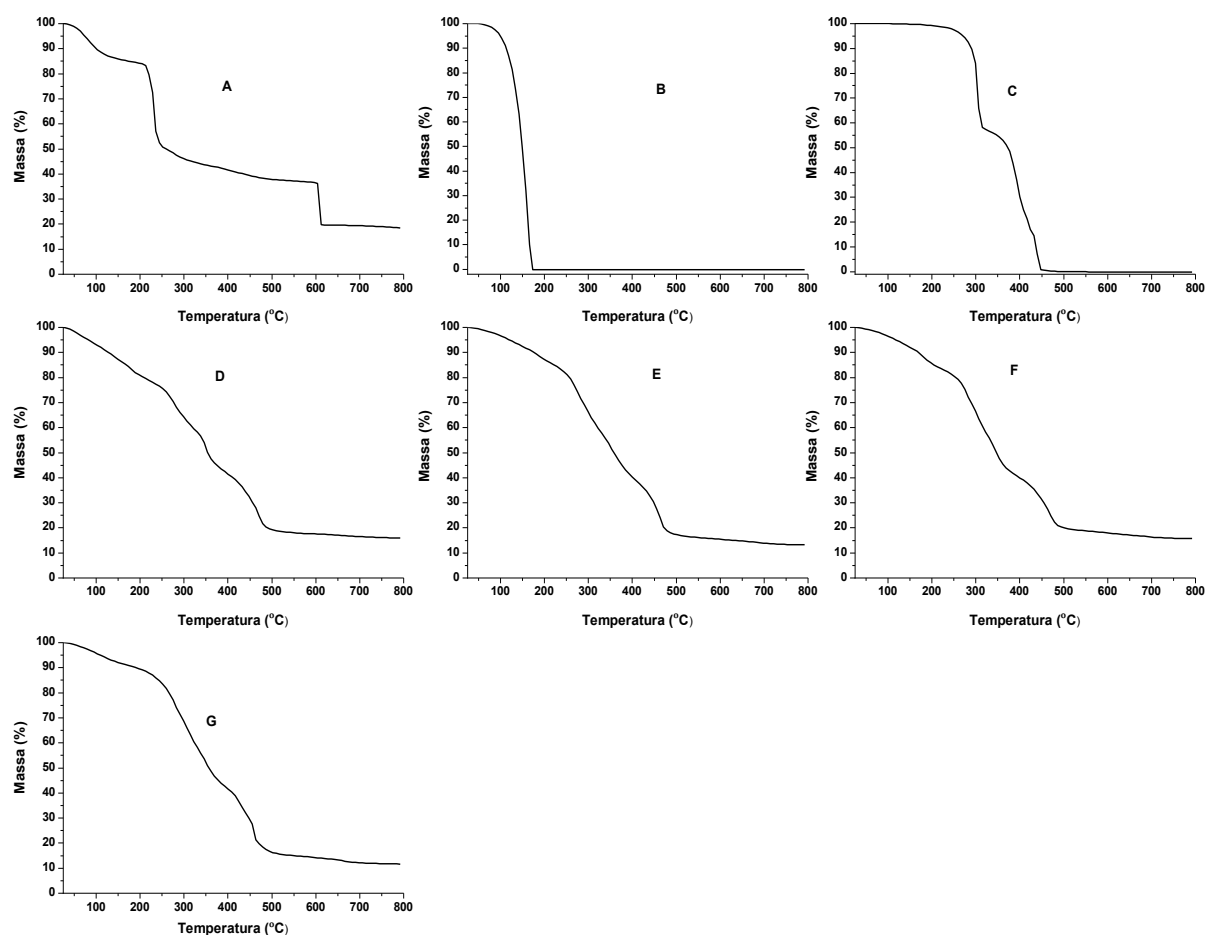


FIGURA 85 – CURVAS DE TGA: A) ALGINATO DE SÓDIO PURO, B) *p*-DMB, C) ÓLEO DE MILHO COMERCIAL, D) MILIPARTÍCULAS DE ALGINATO DE CÁLCIO SEM ATRAENTE FLORAL (ALG-CA0%), E,F E G) MILIPARTÍCULAS DE ALGINATO DE CÁLCIO COM O *p*-DMB (ALG-CA1,5, 2,5 E 3,5%, RESPECTIVAMENTE) (ATMOSFERA OXIDATIVA)

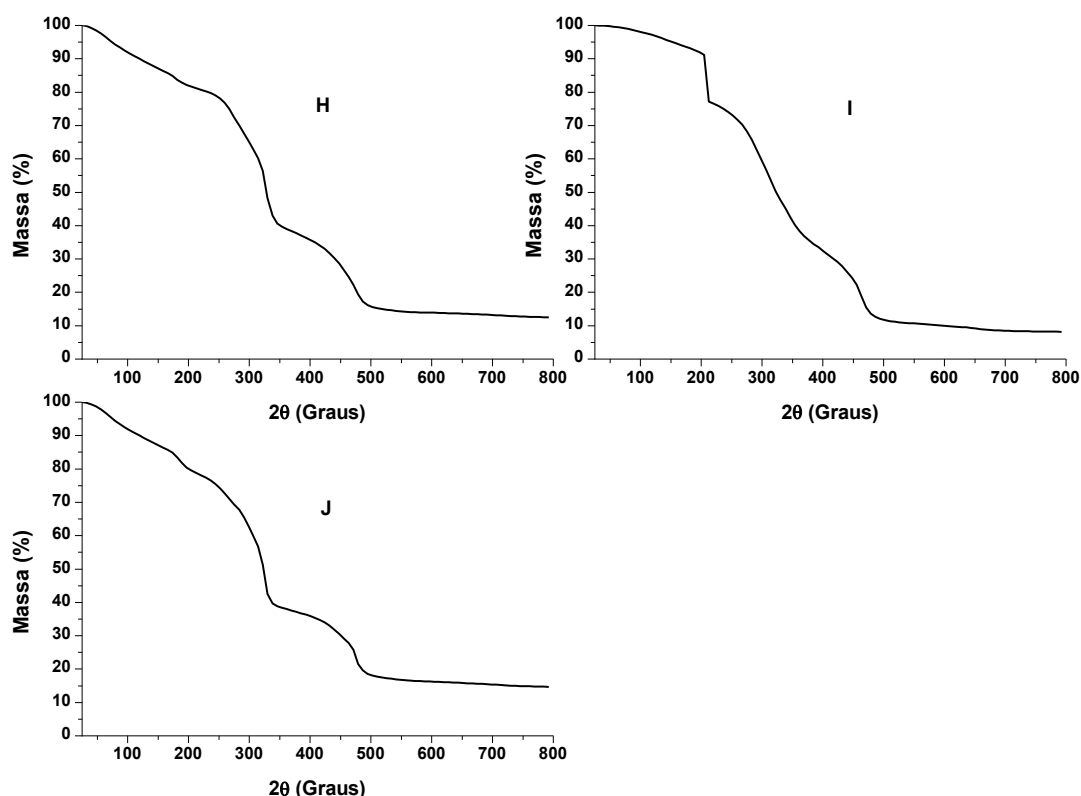


FIGURA 86 – CURVAS DE TGA: H) MILIPARTÍCULAS DE ALGINATO DE CÁLCIO, OTIMIZADAS, SEM ATRAENTE FLORAL (ALG-CA0%), I E J) MILIPARTÍCULAS DE ALGINATO DE CÁLCIO, OTIMIZADAS, COM O *p*-DMB (ALG-CA1,5, 2,5%, RESPECTIVAMENTE) (ATMOSFERA OXIDATIVA)

Foi observado que a curva termogravimétrica para o alginato de sódio apresentou três etapas de perda de massa (FIGURA 85 e 87). A perda de massa de aproximadamente $\Delta_m = 10\%$, tendo início na temperatura de 50°C e término em 120°C , é atribuída à perda de água presa e fisiossorida na amostra analisada.

Já na segunda etapa e terceira etapa perderam massa de $\Delta_m = 60\%$ e $\Delta_m = 15\%$, na faixa de temperatura entre 200 e 260°C e 590 e 625°C , respectivamente, relativas à degradação da matriz polimérica. Logo, o polissacarídeo alginato de sódio mantém-se estável termicamente até a temperatura de 200°C .

O óleo de milho comercial apresentou estabilidade térmica em uma temperatura superior (245°C) comparado ao alginato de sódio puro (200°C). Perdeu massa em três etapas distintas (250 a 325°C - $\Delta_m = 43\%$; 340 a 425°C - $\Delta_m = 22\%$ e 425 a 460°C - $\Delta_m = 35\%$). Portanto, essa perda de massa está associada a eventos exotérmicos entre 250 e 460°C (FIGURA 87).

Por sua vez, o atraente floral *p*-DMB apresentou estabilidade térmica inferior (94°C) a ambos: alginato de sódio e óleo de milho puros (FIGURA 85).

É possível notar que as milipartículas de alginato de cálcio sem e com o atraente floral, sem e com otimização, apresentaram estabilidade térmica menor que a observada para o alginato de sódio puro, tendo início seus processos de perda de massa, a partir do começo da análise térmica, na temperatura de 25°C que pode estar relacionado com perda de água residual (FIGURA 85 e 86). As amostras mesmo que tenham sido secas, fazem ligações hidrogênio com a água e a perda pode ocorrer até acima de 100°C.

Mesmo em atmosfera oxidativa, as amostras não foram completamente degradadas, sendo considerado a massa residual, observada nas curvas de TGA, material carbonáceo, produto de decomposição das amostras avaliadas (RIEKES *et al.*, 2011).

Esta avaliação sugere que a presença tanto do óleo de milho como do *p*-DMB contribuem para a diminuição das estabilidades do alginato presente. Embora que com a presença de ligações cruzadas ou reticulação, o aumento da estabilidade era esperado. Estas observações, juntamente com os dados obtidos por calorimetria exploratória diferencial, anteriormente mostrados, reforçam a hipótese de que o atraente floral foi encapsulado.

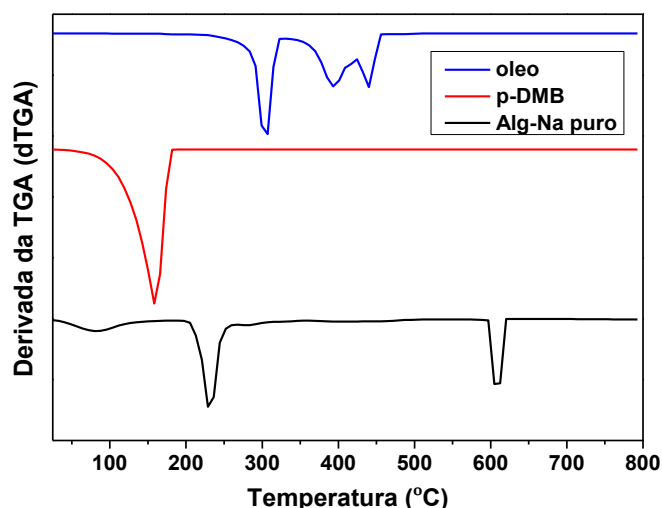


FIGURA 87 – GRÁFICOS DA PRIMEIRA DERIVADA DAS CURVAS DE ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA) DOS CONSTITUINTES NO PREPARO DAS MILIPARTÍCULAS DE ALGINATO DE CÁLCIO: (—) ÓLEO DE MILHO COMERCIAL, (—) *p*-DMB PURO E (—) ALGINATO DE SÓDIO PURO (ALG-NA)

5.6.6. Avaliação morfológica e de superfície das milipartículas de alginato de cálcio, sem e com otimização e das misturas físicas alginato de sódio/p-DMB (filmes)

Pelas fotomicrografias das milipartículas de alginato de cálcio, sem e com otimização, sem e com o atraente floral (FIGURA 88), em quantidades diferentes e crescentes, pode ser visto, claramente, que a morfologia das amostras foi esférica com uma tendência à forma oval. O diâmetro das partículas avaliadas variaram de 2 a 3 mm como evidenciado nas fotomicrografias. Pela FIGURA 88C, a superfície de algumas milipartículas apresentaram fraturas que são causadas por colapso parcial da matriz polimérica devido à desidratação das partículas (PASPARAKIS E BOUROPOULOS, 2006).

As imagens das amostras de milipartículas, em aumentos de 2000x e 5000x (FIGURA 89) evidenciaram, mais claramente, as superfícies das milipartículas, que se mostraram rugosas com poucos poros distribuídos em sua extensão. Portanto, estas fraturas e poros presentes nas milipartículas podem vir a facilitar a liberação do atraente floral incorporado, em etapas futuras deste trabalho.

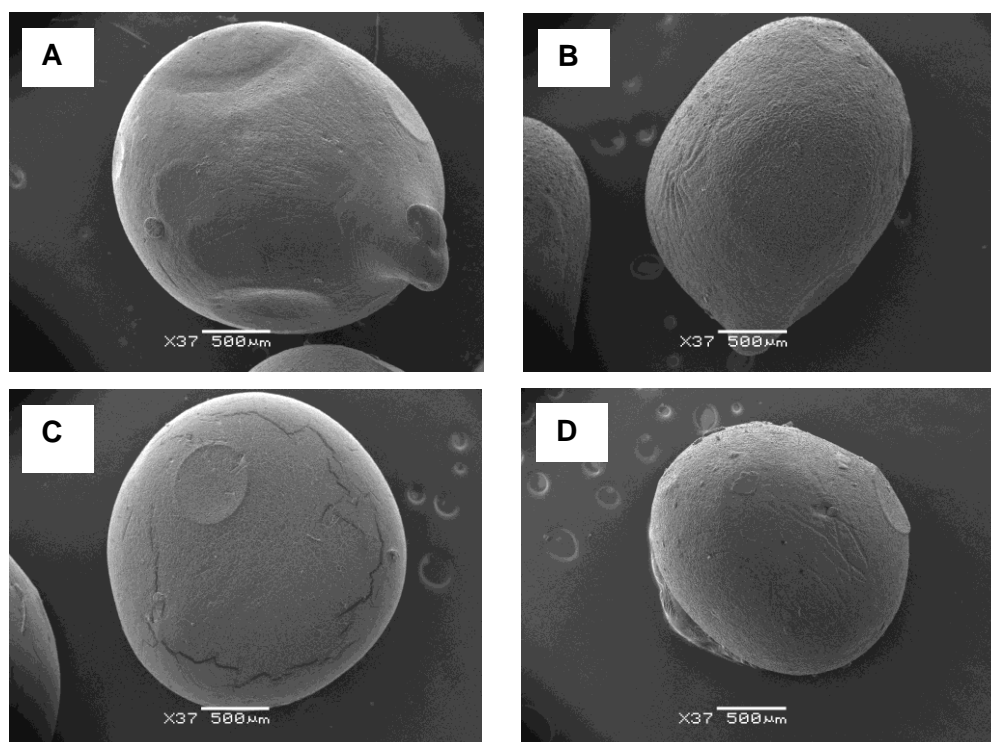


FIGURA 88 – FOTOMICROGRAFIAS OBTIDAS POR MEV DAS MILIPARTÍCULAS DE ALGINATO DE CÁLCIO, SEM OTIMIZAÇÃO: (A) ALG-CA 0%, (B) ALG-CA 1,5%, (C) ALG-CA 2,5% E (D) ALG-CA 3,5%. AUMENTO DE 37X

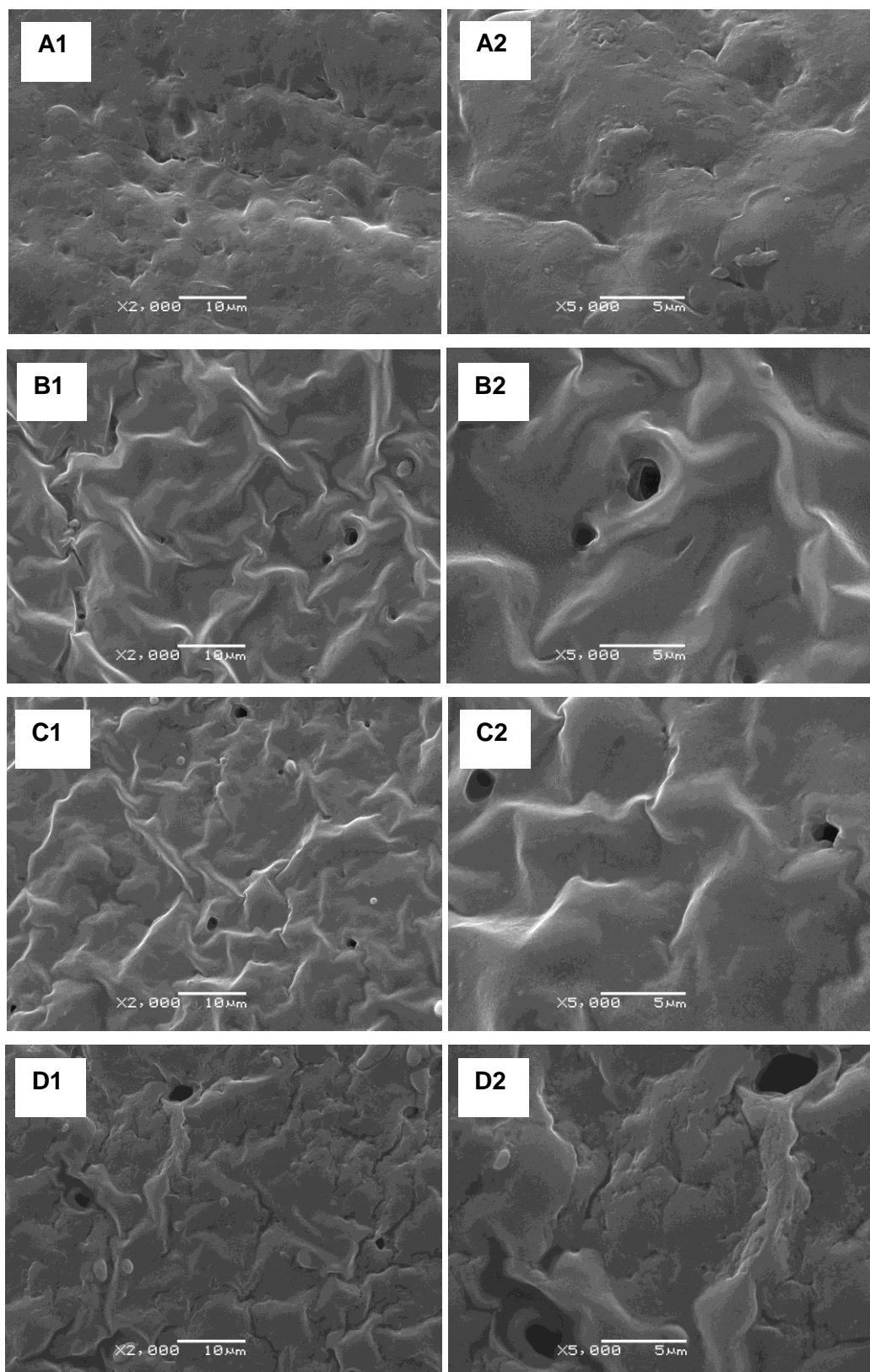


FIGURA 89 – FOTOMICROGRAFIAS OBTIDAS POR MEV DAS SUPERFÍCIES DAS MILIPARTÍCULAS DE ALGINATO DE CÁLCIO, SEM OTIMIZAÇÃO: (A1 E A2) ALG-CA 0%, (B1 E B2) ALG-CA 1,5%, (C1 E C2) ALG-CA 2,5% E (D1 E D2) ALG-CA 3,5%. AUMENTOS DE 2000X E 5000X

Pela fotomicrografia do filme de alginato de sódio não reticulado, com óleo de milho sem *p*-DMB (FIGURA 90A) foi observada perda de textura da superfície, não sendo evidenciado presença de poros distribuídos pelo filme. Assim como para o filme de alginato de sódio/óleo/*p*-DMB na proporção 1,5%(m/V) (FIGURA 90B). Em estudo realizado por Benavides e colaboradores (2012) filmes de alginato contendo óleo essencial de orégano apresentaram esta característica e, por avaliação da seção trasversal dos filmes foi observado empilhamento das camadas tornando-as mais compactas.

O aumento da concentração de atraente floral *p*-DMB, este cristalino, no preparo dos filmes, alterou o aspecto de superfície dos filmes (FIGURA 90C e D). Esta alteração de superfície pode ser atribuída à presença do *p*-DMB disperso na matriz polimérica.

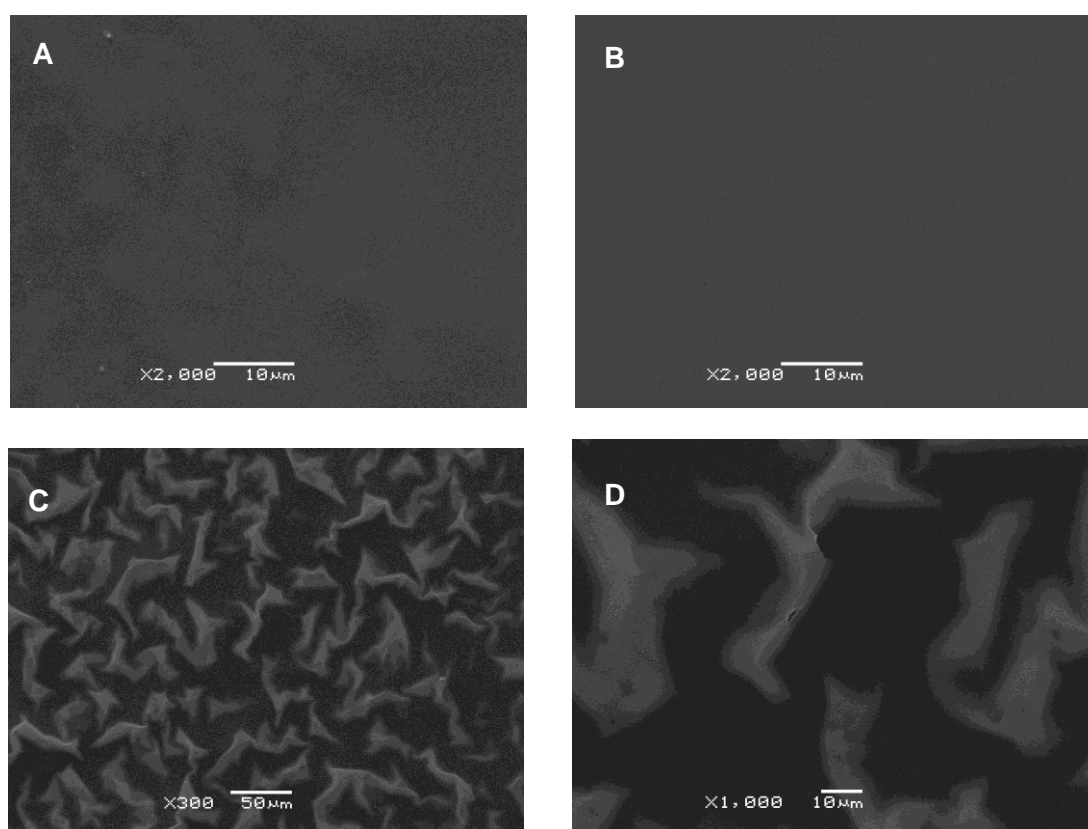


FIGURA 90 – FOTOMICROGRAFIAS DAS MISTURAS FÍSICAS ALGINATO/ÓLEO/ATIVO (FILMES): (A)ALGINATO/ÓLEO,(B)ALGINATO/ÓLEO/ATIVO(1,5%),(C,D)ALGINATO/ÓLEO/ATIVO (2,5%). AUMENTOS DE 300X, 1000X E 2000X

5.7. DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (EE%) PARA AS MILIPARTÍCULAS DE ALGINATO DE CÁLCIO: MÉTODO DIRETO E INDIRETO

Os espectros de absorção das soluções de extração, tanto pelo método direto como pelo o indireto (soluções aquosas foram extraídas com clorofórmio), provenientes de cada amostra de milipartículas desenvolvidas neste estudo, mostraram pico máximo de absorção em 240nm, similar aos obtidos para as soluções padrão do *p*-DMB em clorofórmio e já mostrados na discussão dos resultados da seção 5.3.1.

A avaliação quantitativa das amostras, por espectrofotometria na região do ultravioleta, permitiu determinar a taxa de encapsulação do *p*-DMB. A eficiência de encapsulação foi satisfatória (TABELA 27 e 28), devido à estabilidade das emulsões sem e com otimização, após 24 horas, utilizadas no preparo das formulações e à tendência de soluções aquosas de alginato de sódio mais concentradas serem mais viscosas e, por consequência, possuírem a habilidade em reter melhor o material a ser encapsulado, como já relatado por Chan (2011).

Este fato pode ser explicado pela baixa solubilidade do *p*-DMB em água, que permite sua permanência solubilizado na fase oleosa e o óleo, por sua vez, por meio da formação de uma emulsão, torna-se completamente disperso, na forma de gotículas contendo o atraente floral, na solução aquosa de alginato de sódio (fase contínua) (LACERDA *et al.*, 2014). A etapa de reticulação ou geleificação é responsável pelo entrapamento do composto na rede tridimensional polimérica formada.

Além disso, como relatado por Ribeiro e colaboradores (1999), o alginato gel age como uma barreira que retém as gotículas de óleo em discretas “bolsas” no interior da matriz do gel, que permite a obtenção de milipartículas de alginato de cálcio com alta eficiência de encapsulação.

TABELA 27 – FORMULAÇÕES DE MILIPARTÍCULAS DE ALGINATO DE CÁLCIO, SEM OTIMIZAÇÃO, COM DIFERENTES E CRESCENTES QUANTIDADES DE *p*-DIMETOXIBENZENO ADICIONADO E SUAS RESPECTIVAS PORCENTAGENS DE INCORPORAÇÃO DO ATRAENTE FLORAL, QUANTIFICADAS PELO MÉTODO DO ULTRAVIOLETA E VISÍVEL (UV-VIS) POR DUAS FORMAS: DIRETA E INDIRETA

| Amostras de milipartículas de alginato | Composição das amostras de alginato (sem otimização) | | | | Eficiência de encapsulação (%) | |
|--|---|-------------|-----------------|----------------------|-----------------------------------|--------------------|
| | Alginato ^a (g) | Óleo (g) | Tween 80 (g) | <i>p</i> -DMB (g) | Método direto | Método indireto |
| Alg-Ca (0%) | 0,625 | 2,7 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Alg-Ca (1,5%) | 0,625 | 2,7 | 1 | 0,0450 | 75,55 | 80,00 |
| Alg-Ca (2,5%) | 0,625 | 2,7 | 1 | 0,0625 | 95,72 | 77,61 |
| Alg-Ca (3,5%) | 0,625 | 2,7 | 1 | 0,0880 | 70,35 | 86,90 |

^a 25mL DE SOLUÇÃO AQUOSA DE ALGINATO DE SÓDIO 2,5% (m/V)

TABELA 28 – FORMULAÇÕES DE MILIPARTÍCULAS DE ALGINATO DE CÁLCIO, COM OTIMIZAÇÃO, COM DIFERENTES E CRESCENTES QUANTIDADES DE *p*-DMB ADICIONADO E SUAS RESPECTIVAS PORCENTAGENS DE INCORPORAÇÃO DO ATRAENTE FLORAL, QUANTIFICADAS PELO MÉTODO DE ESPECTROFOTOMETRIA DO ULTRAVIOLETA E VISÍVEL (UV-VIS) POR UMA ÚNICA FORMA: A DIRETA

| Amostras de milipartículas de alginato | Composição das amostras de alginato (com otimização) | | | | | Eficiência de encapsulação (%) |
|---|---|-------------|-----------------|---------------|----------------------|-----------------------------------|
| | Alginato ^a (g) | Óleo (g) | Tween 80 (g) | Span60 (g) | <i>p</i> -DMB (g) | Método direto |
| Alg-Ca (0%) | 2,225 | 8,35 | 0,2 | 0,8 | 0 | 0 |
| Alg-Ca (1,5%) | 2,225 | 8,35 | 0,2 | 0,8 | 0,15 | 93,25 |
| Alg-Ca (2,5%) | 2,225 | 8,35 | 0,2 | 0,8 | 0,25 | 95,85 |

^a 89 mL DE SOLUÇÃO AQUOSA DE ALGINATO DE SÓDIO 2,5% (m/V)

As amostras de milipartículas de alginato de cálcio, não otimizadas, quando secas por liofilização, não apresentaram eficiência de encapsulação satisfatória (TABELA 29). A liofilização, como já relatado anteriormente, causa porosidade na superfície das amostras, que facilita a perda do atraente floral volátil durante o

processo. O próprio método de secagem por liofilização, baseado na sublimação da água, presente nas amostras, pode provocar a mesma mudança de estado físico no *p*-DMB.

Portanto, o melhor método de secagem adotado para estes sistemas, é o processo de secagem à temperatura ambiente.

TABELA 29 - EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO PARA AS MILIPARTÍCULAS DE ALGINATO DE CÁLCIO LIOFILIZADAS, SEM OTIMIZAÇÃO, OBTIDAS POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA (400-200nm)

| Formulações de milipartículas | <i>p</i> -DMB (g) | Eficiência de encapsulação (%) ^{a,b} |
|-------------------------------|----------------------|---|
| Alg-Ca (0%) | 0 | 0 |
| Alg-Ca (1,5%) | 0,0375 | 40,57 |
| Alg-Ca (2,5%) | 0,0625 | 26,29 |
| Alg-Ca (3,5%) | 0,0875 | 18,68 |

^a EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DETERMINADA POR UV-VIS EM 240nm, UMA ÚNICA VEZ

^b DETERMINAÇÃO DO TEOR DE *p*-DMB INCORPORADO NO INTERIOR DAS MILIPARTÍCULAS DE ALGINATO DE CÁLCIO LIOFILIZADAS, MÉTODO DIRETO

5.8. LIBERAÇÃO *IN VITRO* DAS MILIPARTÍCULAS DE ALGINATO DE CÁLCIO SEM (SOT) E COM OTIMIZAÇÃO (OT)

As milipartículas de alginato de cálcio contendo o atraente floral apresentaram mesmo perfil de cromatograma e espectro de massas, observado para as amostras de micropartículas de PHBV (espectros e cromatogramas discutidos anteriormente na seção 5.4. Foi observado pico do *p*-DMB, no tempo de retenção (*Tr*) de 5,75 minutos. De forma qualitativa, o atraente floral foi liberado durante os seis dias de ensaios realizados. A avaliação quali e quantitativa para estes sistemas foi feita a cada 24 horas, assim como para as micropartículas de PHBV.

A partir da avaliação quantitativa da liberação das amostras foi possível construir as curvas de liberação ilustradas nas FIGURA 91 e 92 para as amostras não otimizadas e otimizadas, respectivamente.

AMOSTRAS SEM OTIMIZAÇÃO (SOT)

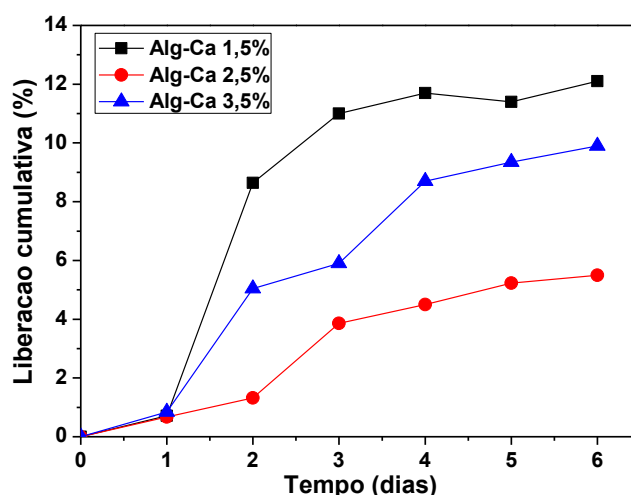


FIGURA 91 – CURVAS DE LIBERAÇÃO CUMULATIVA (%) PARA AS MILIPARTÍCULAS DE ALGINATO DE CÁLCIO, SEM OTIMIZAÇÃO (SOT), CONTENDO O ATRAENTE FLORAL (ALG-CA 1,5%, EM PRETO; 2,5%, EM VERMELHO E 3,5%, EM AZUL)

AMOSTRAS OTIMIZADAS (OT)

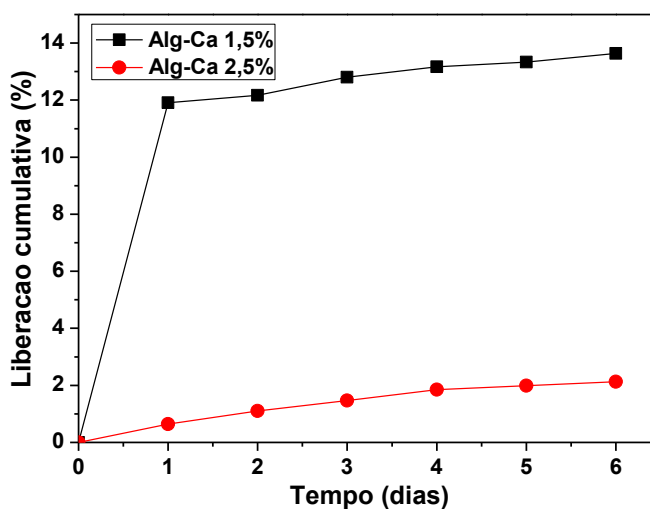


FIGURA 92 – CURVAS DE LIBERAÇÃO CUMULATIVA (%) PARA AS MILIPARTÍCULAS DE ALGINATO DE CÁLCIO, OTIMIZADAS (OT), CONTENDO O ATRAENTE FLORAL (ALG-CA 1,5%, EM PRETO E ALG-CA 2,5%, EM VERMELHO)

A presença dos tensoativos Tween 80 e Span 60 nas formulações de milipartículas, torna as amostras mais permeáveis, facilitando desta forma a liberação, quando comparadas às micropartículas de PHBV. A massa molar pequena, o estado menos cristalino do atraente floral solubilizado na fração oleosa e a característica amorfa do alginato, utilizado no preparo das milipartículas, facilitam a liberação. Por isso maior porcentagem de liberação foi observada para estes sistemas quando comparado com o polímero PHBV.

Além disso, o cálcio presente na matriz polimérica, não necessariamente, está ligado completamente ao grupo carboxilato do alginato de sódio, existindo portanto como cloreto de cálcio nas partículas. Se as milipartículas fossem mais reticuladas, provavelmente não teria sido observada esta taxa de liberação para o *p*-DMB incorporado. Estes dados estão de acordo com o observado por Moebus e colaboradores (2012). Além disso, o efeito burst (liberação rápida observado nos primeiros dias) para a amostra Alg-Ca1,5% otimizada pode estar relacionado à fraca retenção do atraente floral na estrutura do alginato como também à presença do composto mais próxima à superfície. Enquanto que para a formulação Alg-Ca2,5% o aprisionamento do *p*-DMB foi mais efetivo e uniformemente distribuído por toda o interior da partícula (SILVA *et al.*, 2006).

Ao comparar a liberação do *p*-DMB puro (FIGURA não mostrada) com as milipartículas de alginato de cálcio, nas mesmas condições de estudo, foi possível observar que o atraente floral atingiu a liberação de 100% dentro dos seis dias de ensaios de liberação, enquanto que as formulações de milipartículas, de forma geral, não ultrapassaram os 14%. Portanto, de acordo com a literatura, a liberação é mais lenta para as amostras frente ao *p*-DMB puro (ALIPOUR *et al.*, 2010).

E por meio das concentrações obtidas pelos ensaios de liberação, foi determinada a quantidade em massa do atraente floral, liberado em cada dia estudado (durante 6 dias) para as amostras sem e com otimização (TABELA 30 e 31). Em 1,0g de milipartículas de alginato de cálcio, designadas como Alg-Ca1,5, 2,5 e 3,5%, foram determinadas, para as amostras sem otimização, 7,8, 13,6 e 13,6mg de *p*-DMB incorporado (TABELA 30), enquanto que para as amostras otimizadas, foram encontrados 12,1 e 20,1mg de atraente floral incorporado (TABELA 31), na massa aerada, com base na eficiência de encapsulação, determinada por espectrofotometria na região do ultravioleta.

As massas totais liberadas de atraente floral para as milipartículas de alginato de cálcio, não otimizadas, foram 0,983, 0,756 e 1,345 mg por grama de milipartículas Alg-Ca1,5, 2,5 e 3,5%, respectivamente (TABELA 30), enquanto que para as amostras otimizadas os valores encontrados foram 1,625 e 0,395mg, para Alg-Ca1,5 e 2,5%, respectivamente. Como já relatado anteriormente, essa quantidade poderia ser aumentada com aumento da temperatura.

Como forma de entender o mecanismo de liberação, o modelo cinético semi-empírico descrito por Korsmeyer-Peppas deveria ser adotado porque ele descreve a liberação de um composto a partir de um sistema polimérico. No entanto, a aplicação deste modelo cinético só é possível quando pelo menos 60% de liberação é observada.

TABELA 30 – QUANTIDADES LIBERADAS DO ATRAENTE FLORAL *p*-DMB A PARTIR DE UM GRAMA DE MILIPARTÍCULAS DE ALGINATO DE CÁLCIO NÃO OTIMIZADAS(SOT), DURANTE O PERÍODO DE SEIS DIAS, EM CÂMARA DE AERAÇÃO COM TEMPERATURA E UMIDADE CONTROLADAS (TEMPERATURA= $24 \pm 3^{\circ}\text{C}$ E UMIDADE= 20%)

| Amostras de alginato ^a | Massa Amostras (g) ^b | Massa <i>p</i> -DMB (mg) ^c | Massa liberada (mg.g ⁻¹) ^d | Massa de <i>p</i> -DMB liberada (dias) | | | | | |
|-----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|---|--|------|------|------|------|------|
| | | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| | | | | (μg) | (μg) | (μg) | (μg) | (μg) | (μg) |
| Alg-Ca1,5% | 1 | 7,8 | 0,983 | 50 | 620 | 190 | 52 | 41 | 30 |
| Alg-Ca2,5% | 1 | 13,6 | 0,756 | 99 | 82,5 | 330 | 104 | 91 | 50 |
| Alg-Ca3,5% | 1 | 13,6 | 1,345 | 117 | 576 | 123 | 365 | 100 | 64 |

^a FORMULAÇÕES DE MILIPARTÍCULAS DE ALGINATO DE CÁLCIO SEM OTIMIZAÇÃO(SOT)

^b MASSA DE MILIPARTÍCULAS DE ALGINATO DE CÁLCIO ADICIONADA NA CÂMARA DE AERAÇÃO

^c MASSA DE *p*-DMB INCORPORADA EM 1g DE MILIPARTÍCULAS DE ALGINATO DE CÁLCIO

^d MASSA DE *p*-DMB CUMULATIVA LIBERADA (CORRESPONDENTE À 12%; 5% E 10% PARA AS AMOSTRAS ALG-CA1,5%; 2,5% E 3,5%, RESPECTIVAMENTE) DURANTE OS SEIS DIAS DE ENSAIOS DE LIBERAÇÃO DE 1g DE MILIPARTÍCULAS DE ALGINATO DE CÁLCIO

TABELA 31 – QUANTIDADES LIBERADAS DO ATRAENTE FLORAL *p*-DMB A PARTIR DE UM GRAMA DE MILIPARTÍCULAS DE ALGINATO DE CÁLCIO OTIMIZADAS (OT), DURANTE O PERÍODO DE SEIS DIAS, EM CÂMARA DE AERAÇÃO COM TEMPERATURA E UMIDADE CONTROLADAS (TEMPERATURA= $24 \pm 3^{\circ}\text{C}$ E UMIDADE= 20%)

| Amostras de alginato ^a | Massa Amostras (g) ^b | Massa <i>p</i> -DMB (mg) ^c | Massa liberada (mg.g ⁻¹) ^d | Massa de <i>p</i> -DMB liberada (dias) | | | | | |
|-----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|---|--|--------|--------|--------|--------|--------|
| | | | | 1 (μg) | 2 (μg) | 3 (μg) | 4 (μg) | 5 (μg) | 6 (μg) |
| Alg-Ca1,5% | 1 | 12,1 | 1,625 | 1440 | 36 | 76,5 | 52 | 21 | 23 |
| Alg-Ca2,5% | 1 | 20,1 | 0,395 | 129 | 97,5 | 67,5 | 74 | 27 | 32 |

^a FORMULAÇÕES DE MILIPARTÍCULAS DE ALGINATO DE CÁLCIO OTIMIZADAS

^b MASSA DE MILIPARTÍCULAS DE ALGINATO DE CÁLCIO ADICIONADA NA CÂMARA DE AERAÇÃO

^c MASSA DE *p*-DMB INCORPORADA EM 1g DE MILIPARTÍCULAS DE ALGINATO DE CÁLCIO

^d MASSA DE *p*-DMB CUMULATIVA LIBERADA (CORRESPONDENTE À 13% E 2% PARA AS AMOSTRAS ALG-CA1,5% E 2,5%, RESPECTIVAMENTE) DURANTE OS SEIS DIAS DE ENSAIOS DE LIBERAÇÃO DE 1g DE MILIPARTÍCULAS DE ALGINATO DE CÁLCIO

5.9. EXTRATOS CONTENDO CUCURBITACINAS

O propósito de determinar o teor de cucurbitacinas, substâncias estas responsáveis por causar compulsão alimentar na *D. speciosa*, foi realizar um controle de qualidade do pó de porongo obtido na natureza para desenvolvimento de potencial tecnologia no controle da praga em questão.

A idéia inicial do trabalho foi desenvolver partículas com semioquímico com poder atrativo sobre a praga, uní-las com extratos de cucurbitacinas (que causa a compulsão alimentar) e inseticidas sintéticos como uma nova alternativa no controle populacional da espécie *D. speciosa*.

Estudos preliminares realizados pelo grupo de pesquisa do professor Doutor Maurício Ursi Ventura relataram que extratos obtidos com o solvente etanol causaram o efeito de compulsão alimentar nos insetos da praga estudada. Mesmo misturados à inseticidas sintéticos sua ação foi mantida.

Os extratos etanólicos, a quente e a frio, obtidos a partir do pó de porongo apresentaram odor doce, visto que as cucurbitacinas são produtos naturais que

podem ser encontrados livres ou glicosilados, na natureza. As soluções etanólicas dos extratos a frio apresentaram coloração esverdeada clara, enquanto que a solução dos extratos a quente mostraram um aspecto esverdeado mais escuro (FIGURA 93 e 94) e, após a evaporação do solvente, os extratos tiveram a aparência e viscosidade de açúcar caramelizado.

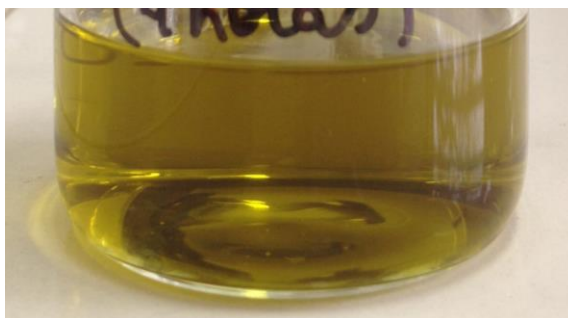


FIGURA 93 – FOTO DA SOLUÇÃO ETANÓLICA DOS EXTRATOS OBTIDOS A FRIO: APARÊNCIA ESVERDEADA CLARA



FIGURA 94 – FOTO DA SOLUÇÃO ETANÓLICA DOS EXTRATOS OBTIDOS A QUENTE : APARÊNCIA ESVERDEADA ESCURA

5.9.1. Determinação quali e quantitativa da cucurbitacina B dihidratada nos extratos

O padrão de cucurbitacina B dihidratada foi detectado na região do ultravioleta no comprimento de onda de 231 nm como mostra a FIGURA 95. O tempo de retenção (Tr) em que o composto foi eluído foi de 5,4 minutos (FIGURA 96).

A partir do cromatograma obtido para o padrão utilizado, foi possível determinar qualitativamente a cucurbitacina B dihidratada presente em todos os extratos preparados: a quente e a frio.

A cucurbitacina B dihidratada presente tanto no extrato obtido a frio (por extrator Soxhlet e agitação magnética simples) como o a quente, eluiu em um tempo de retenção de 5,4 minutos (FIGURA 97 e 98, respectivamente).

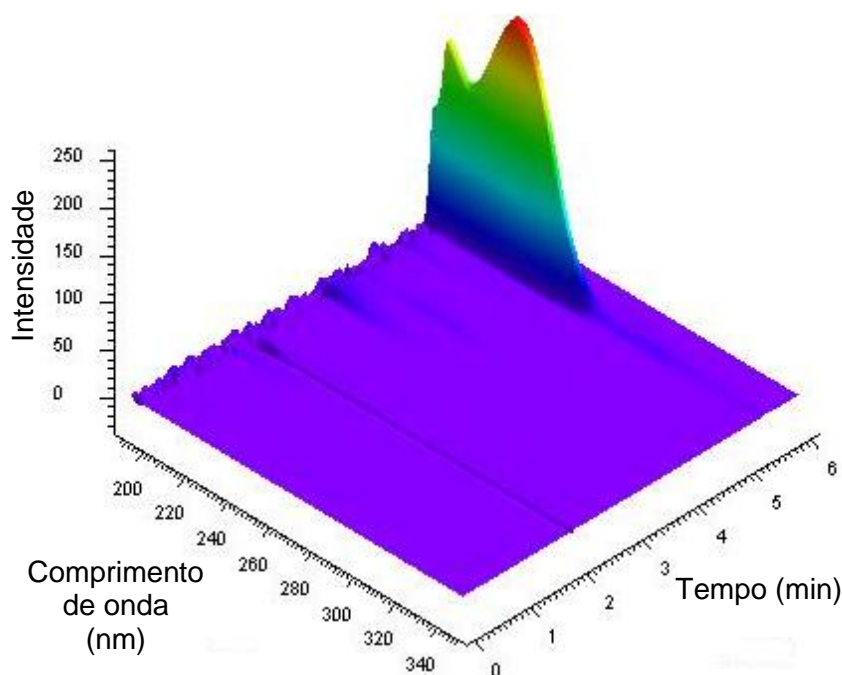


FIGURA 95: ESPECTRO NO ULTRAVIOLETA OBTIDO NO COMPRIMENTO DE ONDA 231 nm, FASE MÓVEL METANOL/ÁGUA 70:30, FLUXO DE 1,0mL.min⁻¹, NA CONCENTRAÇÃO 0,1mg.mL⁻¹, PARA O PADRÃO DE CUCURBITACINA B DIHIDRATADA

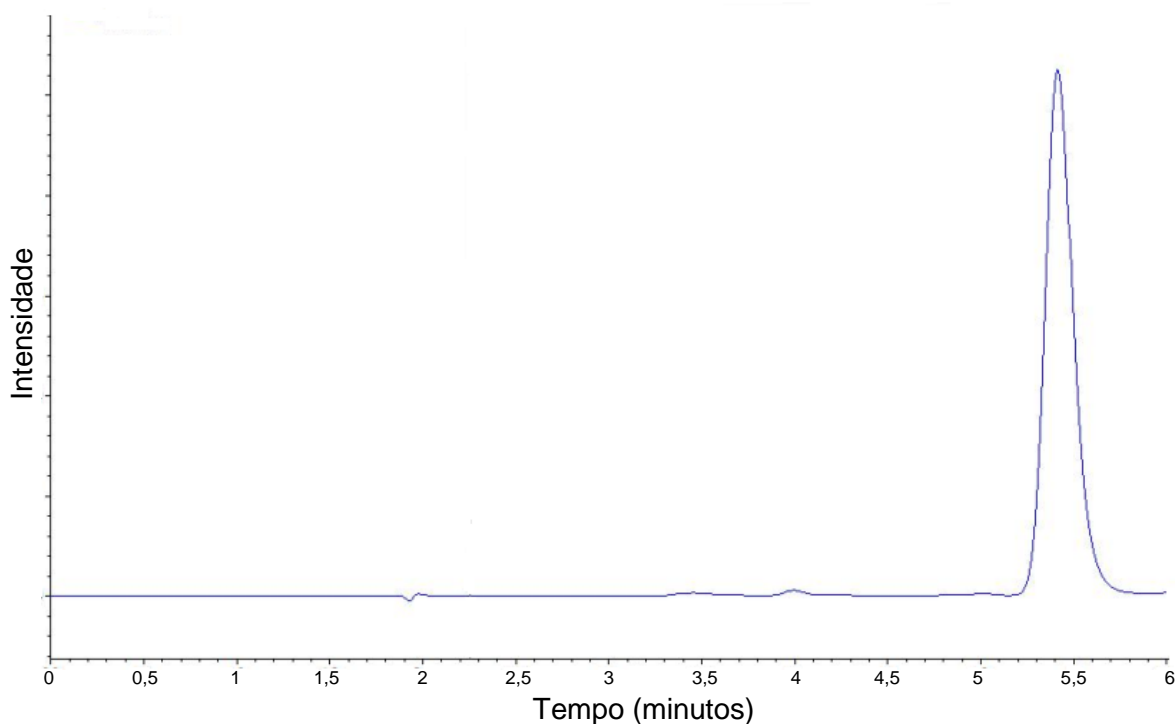


FIGURA 96: CROMATOGRAMA OBTIDO PARA O PADRÃO DE CUCURBITACINA B DIHIDRATADA, POR CLAE NAS SEGUINTE CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS: FASE MÓVEL METANOL/ÁGUA 70:30, FLUXO DE $1,0\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, ELUIÇÃO ISOCRÁTICA. CONCENTRAÇÃO DO PADRÃO $0,1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$

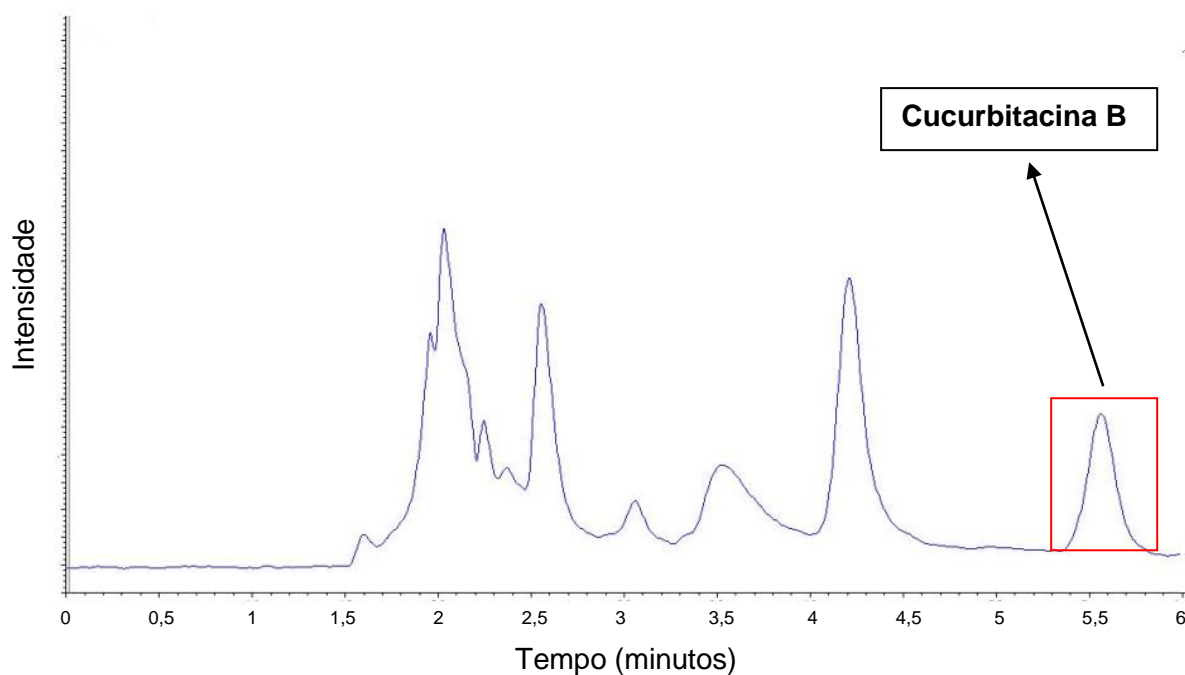


FIGURA 97: CROMATOGRAMA DO EXTRATO OBTIDO A FRIO (POR MEIO DE EXTRATOR SOXHLET E AGITAÇÃO MAGNÉTICA) NA CONCENTRAÇÃO $0,1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, NAS SEGUINTE CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS: FASE MÓVEL METANOL/ÁGUA 70:30, FLUXO DE $1,0\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, ELUIÇÃO ISOCRÁTICA

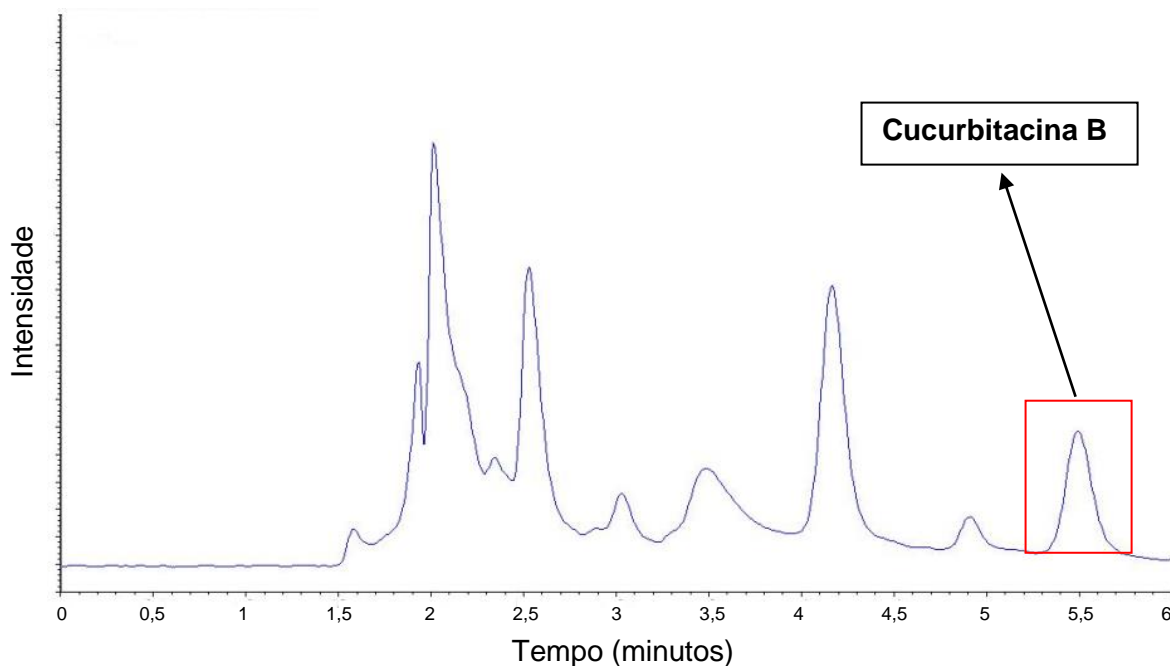


FIGURA 98: CROMATOGRAMA DO EXTRATO OBTIDO A QUENTE NA CONCENTRAÇÃO $0,1\text{mg.mL}^{-1}$, NAS SEGUINTE CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS: FASE MÓVEL METANOL/ÁGUA 70:30, FLUXO DE $1,0\text{mL.min}^{-1}$, ELUIÇÃO ISOCRÁTICA

Pelo método de adição de padrão foi possível determinar quantitativamente a cucurbitacina B dihidratada por grama de pó de porongo utilizado no preparo dos extratos. Este método nos forneceu curvas analíticas, como a mostrada na FIGURA 99, da cucurbitacina B dihidratada com coeficiente de correlação de aproximadamente 0,99, para todos os extratos avaliados. A equação de regressão para a cucurbitacina B dihidratada em extrato obtido a quente foi $y = 6,09993 \text{ E}9X + 41051,4$. Para os demais extratos foram obtidas as seguintes equações $y = 6,09993\text{E}9X + 47207$ e $y = 1,04484\text{E}10X + 29317,2$, respectivamente para o extrato a frio, por Soxhlet e a frio por agitação magnética.

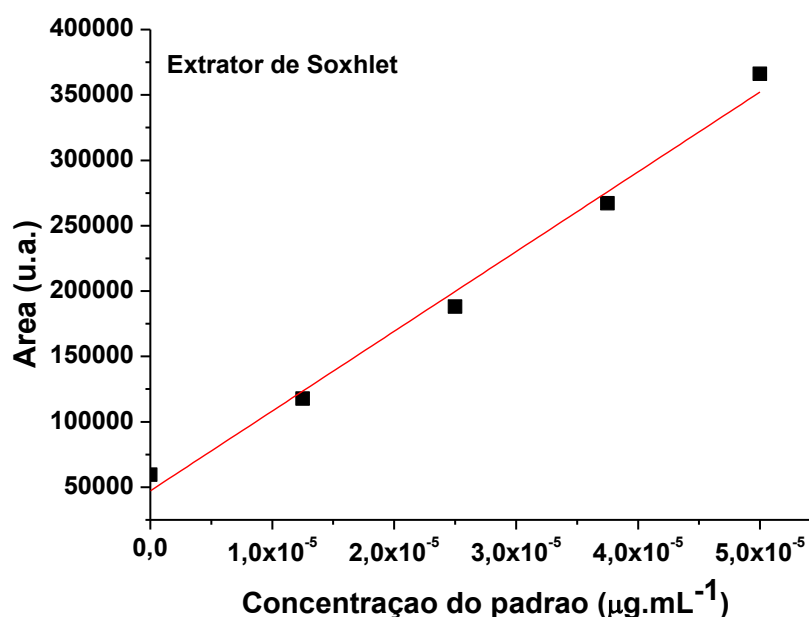


FIGURA 99 – CURVA ANALÍTICA OBTIDA PARA O EXTRATO A FRIO EM SOXHLET, PELO MÉTODO DE ADIÇÃO DE PADRÃO DE CUCURBITACINA B DIHIDRATADA EM CONCENTRAÇÕES DIFERENTES E CRESCENTES

As concentrações observadas para o extrato a quente foi de 120mg de cucurbitacina B por grama de extrato. Por outro lado, as concentrações obtidas para os extratos a frio por meio de Soxhlet e agitação magnética simples foi de 77,4 mg.g⁻¹ e 56 mg.g⁻¹, respectivamente. Estes valores representam 1,18%, 0,99% e 0,36% de cucurbitacinas no pó de porongo. O etanol foi uma boa escolha para extrair as cucurbitacinas, estabelecido nos cromatogramas e concentrações obtidas neste trabalho, porque o etanol é um solvente barato e pouco tóxico, além do composto em questão ser altamente solúvel neste solvente (MACEDO *et al.*, 2007).

A melhor metodologia para extrair as cucurbitacinas do pó de porongo foi a quente. O refluxo do pó de porongo em etanol leva às concentrações mais elevadas, e provou ser mais precisa e não degrada o composto.

6. CONCLUSÃO

As micropartículas de PHBV contendo *p*-DMB foram obtidas pelo método físico-químico de emulsão/evaporação do solvente. Esta observação foi feita por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras apresentaram morfologia esférica e superfície porosa e rugosa, características estas interessantes para os ensaios de liberação do atraente floral.

As análises por infravermelho com transformada de Fourier (IVTF) para as amostras foram conclusivas para afirmar que houve a encapsulação do *p*-DMB. Por meio do tratamento quimiométrico dos dados, via análise de componentes principais (PCA), também foi possível confirmar a encapsulação do composto, já que as amostras de micropartículas de PHBV contendo o atraente floral foram agrupadas como semelhantes entre si e diferentes do polímero puro PHBV e do *p*-DMB puro.

Os resultados obtidos pela avaliação térmica compreendendo a calorimetria exploratória diferencial (DSC) e a análise termogravimétrica (TGA) mostraram que o atraente floral interagiu fisicamente com a matriz polimérica, devido às mudanças nas temperaturas de transição vítrea (T_g), temperatura de fusão cristalina (T_m) e valores de cristalinidade (%C), quando comparado com o polímero puro e as formulações sem conter o *p*-DMB.

A determinação do teor de atraente floral incorporado, por meio da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), se mostrou mais sensível e eficaz na determinação do *p*-DMB encapsulado nas formulações de micropartículas de PHBV quando comparado ao método de espectrofotometria na região do ultravioleta.

Portanto, estes dados de eficiência de encapsulação obtidos juntamente com as fotomicrografias tiradas pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) confirmam a formação das micropartículas de PHBV e a incorporação do atraente floral *p*-DMB.

Os estudos de degradação das micropartículas de PHBV mostraram que a liberação do atraente floral *p*-DMB poderá ocorrer no meio ambiente, por meio da cisão das cadeias.

Os ensaios de liberação também confirmaram a presença do atraente floral na matriz polimérica.

As curvas de liberação mostraram que o atraente floral encapsulado é liberado lentamente do interior das micropartículas de PHBV quando comparada à liberação do *p*-DMB puro, nas condições miméticas ao campo, o que torna possível a aplicação do composto, na forma encapsulada, no controle da espécie *D. speciosa*.

As milipartículas de alginato de cálcio, sem e com otimização, contendo o atraente floral *p*-DMB, foram obtidas com sucesso pelo método de emulsão/geleificação externa. Verificação feita e confirmada pela análise de morfologia e superfície, realizada por microscopia eletrônica de varredura. As amostras de milipartículas de alginato de cálcio mostraram-se rugosas e com a presença de algumas faturas e poucos poros, que poderão favorecer a liberação do atraente floral.

As análises por infravermelho com transformada de Fourier para as milipartículas de alginato de cálcio assim como a análise de componentes principais, sugerem que ocorreu a incorporação do *p*-DMB.

Os resultados obtidos pela avaliação das milipartículas de alginato de cálcio, por análise térmica, compreendendo a calorimetria exploratória diferencial e a análise termogravimétrica mostraram que o atraente floral foi incorporado interagindo favoravelmente com o alginato, o que alterou sua estabilidade térmica.

Logo, estes dados juntamente com as fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura e dados apresentados pelo estudo de eficiência de encapsulação, confirmam a formação das milipartículas de alginato de cálcio contendo o atraente floral *p*-DMB.

Os métodos de espectrofotometria na região do ultravioleta e CLAE mostraram-se eficientes na determinação do atraente incorporado.

Os ensaios de liberação mostraram que o atraente floral foi encapsulado e é liberado lentamente do interior das partículas, quando comparado com a liberação do composto puro. A liberação avaliada para esses sistemas foi mais eficiente que a observada para as micropartículas de PHBV, o que torna as milipartículas de alginato de cálcio, do ponto de vista econômico e de eficiência de encapsulação e liberação, vantajosa no controle da espécie *Diabrotica speciosa*.

A utilização do método de adição de padrão para determinação quantitativa de cucurbitacina B dihidratada presente nos extratos preparados, mostrou-se adequada para o controle de qualidade do pó de porongo, devido à complexidade da amostra e à dificuldade em encontrar um padrão interno adequado.

Embora a extração a quente tenha se mostrado mais eficiente, a extração a frio será de grande valia para aplicação em campo, devido à maior facilidade no preparo no próprio local.

Ao final deste trabalho é possível dizer que todas as informações acumuladas, até o momento, servirão para desenvolver tecnologia alternativa no controle de *D. speciosa*, associando partículas contendo o atraente floral, extratos de cucurbitacinas e inseticida sintético e assim fazer uma aspersão em campo.

REFERÊNCIAS

ABDOLLAHI, M.; ALBOOFETILEH, M.; REZAEI, M.; BEHROOZ, R. Comparing physico-mechanical and thermal properties of alginate nanocomposite films reinforced with organic and/or inorganic nanofillers. *Food Hydrocolloid*. vol. 32, p.416-424, **2013**.

ALIPOUR,S.;MONTASERI,H.;TAFAGHODI,M. Preparation and characterization of biodegradable paclitaxel loaded alginate microparticles for pulmonary delivery. *Colloid Surface B*, vol. 81, p. 521-529, **2010**.

AMERICAN PHARMACEUTICAL ASSOCIATION. Handbook of pharmaceutical excipients. 5 ed. London: Pharmaceutical Press; **2006**.

ANDERSEN, J.F.; PLATTER, R. D.; WEISLEDER, D. Metabolic transformations of cucurbitacins by *Diabrotica virgifera virgifera* leconte and *D.undecimpunctata howardi* barber. *Insect. Biochem*. vol. 18, n.1, p.71-77, **1988**.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (www.anvisa.gov.br). Acessado em 02 de julho de **2014**.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Guia de estabilidade de produtos cosméticos*. Brasília: ANVISA, vol. 1, p. 52, **2004**.

ARRUDA, I. C.; VENTURA, M. U.; SCARMINIO, I. S. Feeding and arrestment responses of *Diabrotica speciosa* to cucurbitacin-content formulations. *Pesq. agropec. bras.*,vol. 40, n. 7, p. 639-643, **2005**.

ARRUDA-GATTI, I. C.; VENTURA, M. U. Iscas contendo cucurbitacinas para o manejo de *Diabrotica* spp. *Semina: Ciências Agrárias*, vol. 24, n. 2, p. 331-336, **2003**.

ARRUDA-GATTI, I.C.; SILVA, F.A.C.; VENTURA, M.U. Responses of *Diabrotica speciosa* to a semiochemical trap characteristics. *Braz. Arch. Biol. Techn.*, vol. 49, n. 6, p. 975-980, **2006**.

ASTM International. Standard terminology relating to nanotechnology. Designation: E2456-06.

ÁVILA, C. J.; PARRA, J. R. P. Desenvolvimento de *Diabrotica speciosa* (Germar) (COLEOPTERA: CHRYSOMELIDAE) em diferentes hospedeiros. *Ciência Rural* vol. 32, n. 5, p. 739-743, **2002**.

BAZZO, G.C.; SENNA, L.E.; PIRES, A.T.N. Poly(hydroxybutyrate)/chitosan/ketoprofen or piroxicam composite microparticles: Preparation and controlled drug release evaluation. *Carbohydr Polym*, vol. 77, p. 839-844, **2009**.

BECK, R. C. R.; LIONZO, M. I. Z.; COSTA, T. M. H.; BENVENUTTI, E. V.; RÉ, M. I.; GALLAS, M. R.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Surface morphology of spray-dried nanoparticle-coated microparticles designed as an oral drug delivery system. *Braz J Chem Eng*, vol. 25, n. 2, **2008**.

BETANCUR-ANCONA, D.; PACHECO-AGUIRRE, J.; CASTELLANOS-RUELAS, A.; CHEL-GUERRERO, L. Microencapsulation of papain using carboxymethylated flamboyant (*Delonix regia*) seed gum. *Innov. Food Sci. Emerg.* vol. 12, n.1, p.67-72, **2011**.

BETZ, M.; KULOZIK, U. Whey protein gels for the entrapment of bioactive anthocyanins from bilberry extract. *Int. Dairy J.* vol. 21, n.9, p.703-710, **2011**.

BRAGAGNI, M.; BENEITEZ, C.; MARTÍN, C.; DE LA OSSA, D. H. P.; MURA, P. A.; GIL-ALEGRE, M. E. Selection of PLA polymers for the development of injectable prilocaine controlled release microparticles: Usefulness of thermal analysis. *Int. J. Pharm.* vol. 441, p.468-475, **2013**.

CANEVAROLO JR., S.V. Técnicas de Caracterização de Polímeros. São Paulo: Artliber Editora, **2004**.

CARMINATTI, C. A. Copolímeros de 3-Hidroxibutirato-co-3-Hidroxivalerato (PHBV) produzidos por *Chromobacterium violaceum*. Florianópolis, UFSC, **2008**. Tese Doutorado.

CHAN, E. S. Preparation of Ca-alginate beads containing high oil content: Influence of process variables on encapsulation efficiency and bead properties. *Carbohydr Polym*, vol. 84, p. 1267-1275, **2011**.

CHANDRA, R.; RUTSGI, R. Biodegradable polymers. *Prog. Polym. Sci.*, vol. 23, n.7, p.1273-1335, **1998**.

CHÁVARRI, M.; MARANÓN, I.; ARES, R.; IBÁÑEZ, F. C.; MARZO, F.; VILLARÁN, M. DEL CARMEN. Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. *Int. J. Food Microbiol.* vol. 142, p.185-189, **2010**.

CHUAH, A. M.; KUROIWA, T.; KOBAYASHI, I.; ZHANG, X.; NAKAJIMA, M. Preparation of uniformly sized alginate microspheres using the novel combined methods of microchannel emulsification and external gelation. *Colloid. Surface A.*, vol. 351, p. 9-17, **2009**.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Introdução a métodos cromatográficos. Campinas: Editora da Unicamp, **1990**.

DA SILVA, L. F.; GOMEZ, J.G.C.; ROCHA, R. C. S.; TACIRO, M. K.; PRADELLA, J. G. DA C. Produção biotecnológica de poli-hidroxialcanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil. *Quim. Nova*, vol. 30, n. 7, p.1732-1743, **2007**.

DA SILVA-JUNIOR, A. A.; DE MATOS, J. R.; FORMARIZ, T. P.; ROSSANEZI, G.; SCARPA, M. V.; DO EGITO, E. S. T.; DE OLIVEIRA, A. G. Thermal behavior and

stability of biodegradable spray-dried microparticles containing triamcinolone. *Int. J. Pharm.* vol. 368, p. 45-55, **2009**.

DE AZEREDO, H. M. C. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. *Alim. Nutr.* vol. 16, n.1, p.89-97, **2005**.

DE SENA, M. M.; POPPI, R. J.; FRIGHETTO, R. T. S.; VALARINI, P. J. Avaliação do uso de métodos quimiométricos em análise de solos. *Quim Nova* vol. 23, n. 4, p. 547-556, **2000**.

DOMINGUES, G. S.; GUTERRES, S.S.; BECK, R.C.S; Adriana Raffin POHLMANN. Micropartículas nanorrevestidas contendo um fármaco modelo hidrofóbico: preparação em etapa única e caracterização biofarmacêutica. *Quim Nova*, vol. 31, n. 8, **2008**.

EMBRAPA MILHO E SORGO. Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias – milho e sorgo (www.embrapa.br/milhoesorgo). Acessado em 23 de junho de **2014**.

FARAGO, P. V.; RAFFIN, R. P.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; ZAWADZKI, S. F. Physicochemical Characterization of a Hydrophilic Model Drug-Loaded PHBV Microparticles Obtained by the Double Emulsion/Solvent Evaporation Technique. *J. Braz. Chem. Soc.*, vol. 19, n. 7, p. 1298-1305, **2008**.

FERREIRA, J. T. B.; CORREIA, A. G.; VIEIRA, P. C. Produtos naturais no controle de insetos; Editora da UFSCar; São Carlos, **2001**.

FRITZEN-FREIRE, C. B.; PRUDENCIO, E. S.; AMBONI, R. D. M. C.; PINTO, S. S.; NEGRÃO-MURAKAMI, A. N.; MURAKAMI, F. S. Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics. *Food Res. Int.* vol. 45, p.306-312, **2012**.
GENNARO, A. R. Remington: A Ciência e a Prática da Farmácia. 20 ed., p. 759-763, **2004**.

GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Res. Int.*, vol. 40, p. 1107- 1121, **2007**.

GRILLO, R.; PEREIRA, A. E. S.; MELO, N. F. S.; PORTO, R. M.; FEITOSA, L. O.; TONELLO, P. S.; FILHO, N. L. D.; ROSA, A. H.; LIMA, R.; FRACETO, L. F. Controlled release system for ametryn using polymer microspheres: Preparation, characterization and release kinetics in water. *J. Hazard. Mater.*, vol. 186, p. 1645-1651, **2011**.

GÜRSEL, I.; KORKUSUZ, F.; TÜRESIN, F.; ALAEDDINOGLU, N. G.; HASIRCI, V. In vivo application of biodegradable controlled antibiotic release systems for the treatment of implant-related osteomyelitis. *Biomaterials*, vol. 22, p. 73 – 80, **2001**.

HABIB, L.; Jraij, A.; KHREICH, N.; FESSI, H.; CHARCOSSET, C.; GREIGE-GERGES, H. Morphological and physicochemical characterization of liposomes loading cucurbitacin E, an anti-proliferative natural tetracyclic triterpene. *Chem. Phys. Lipids*. vol. 177, p. 64-70, **2014**.

HEIDEBACH, T.; FÖRST, P.; KULOZIK, U. Influence of casein-based microencapsulation on freeze-drying and storage of probiotic cells. *J. Food Eng.* vol. 98, n.3, p.309-316, **2010**.

HEINECK-LEONEL, M. A.; SALLES, L. A. B. Incidência de Parasitóides e Patógenos em Adultos de *Diabrotica speciosa* (Germ.) (Coleoptera: Chrysomelidae) na Região de Pelotas, RS. *An. Soc. Entomol. Brasil* vol. 26, p. 81-85, **1997**.

HU, Y.; JIANG, X.; DING, Y.; ZHANG, L.; YANG, C.; ZHANG, J.; CHEN, J.; YANG, Y. Preparation and drug release behaviors of nimodipine-loaded poly(caprolactone)–poly(ethylene oxide)polylactide amphiphilic copolymer nanoparticles. *Biomaterials*, vol.24, p. 2395-2404, **2003**.

HUNT, N. C.; SMITH, A. M.; GBURECK, U.; SHELTON, R. M.; GROVER, L. M. Encapsulation of fibroblasts causes accelerated alginate hydrogel degradation. *Acta Biomater.*, **2010**, doi:10.1016/j.actbio.2010.03.026.

JUN-XIA, X.; HAI-YAN, Y.; JIAN, Y. Microencapsulation of sweet orange oil by complex coacervation with soybean protein isolate/gum Arabic. *Food Chem.* vol. 125, n.4, p.1267-1272, **2011**.

KE, Y.; WANG, Y. J.; REN, L.; ZHAO, Q. C.; HUANG, W. Modified PHBV scaffolds by in situ UV polymerization: Structural characteristic, mechanical properties and bone mesenchymal stem cell compatibility. *Acta Biomaterialia*, **2010**.

KÖSE, G. T.; KORKUSUZ, F.; ÖZKUL, A.; SOYSAL, Y.; ÖZDEMİR, T.; YILDIZ, C.; HASIRCI, V. Tissue engineered cartilage on collagen and PHBV matrices. *Biomaterials*, vol. 26, p. 5187–5197, **2005**.

Lacerda, L.; Parize, A. L.; Fávere, V.; Laranjeira, M. C. M. L.; Stulzer, H. K. Development and evaluation of pH-sensitive sodium alginate/chitosan microparticles containing the antituberculosis drug rifampicin. *Mater. Sci. Eng. C* vol. 39, p.161-167, **2014**.

LAOHASONGKRAM, K.; MAHAMAKUDSANEE, T.; CHAIWANICHSIRI, S. Microencapsulation of Macadamia oil by spray drying. *Procedia Food Sci.* vol. 1, p.1660-1665, **2011**.

LERTSUTTHIWONG,P.;NOOMUN,K.;JONGAROONNGAMSANG,N.;PROJSITTHIS AK,P.NIMMANNIT, U. Preparation of alginate nanocapsules containing turmeric oil. *Carbohydr Polim*, vol. 74, p. 209-214, **2008**.

LI, W.; NOOEAD, P.; ROETHER, J. A.; SCHUBERT, D. W.; BOCCACCINI, A. R. Preparation and characterization of vancomycin releasing PHBV coated 45S5 Bioglass®-based glass–ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *J. Eur. Ceram. Soc.*, vol. 34, p. 505-514, **2014**.

LIGIERO, C.B.P.; REIS, L. A.; PARRILHA, G. L.; FILHO, M. B.; CANELA, M.C. Comparação entre métodos de quantificação em cromatografia gasosa: um experimento para cursos de química. *Quim. Nova*, vol. 32, n. 5, p. 1338-1341, **2009**.

LIU, Q. S.; ZHU, M .F.; WU, W. H.; QIN, Z. Y. Reducing the formation of six-membered ring ester during thermal degradation of biodegradable PHBV to enhance its thermal stability. *Polym. Degrad. Stabil.*, vol. 94, p. 18–24, **2009**.

LUO, S.; NETRAVALI, A. N. A study of physical and mechanical properties of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) during composting. *Polym. Degrad. Stabil.* vol. 80, n.1, p. 59-66, **2003**.

MA, J.; JIANG, Y.Z.; SHI,H.; MI, C.; LI, J.; NAN, J. X.; WU, X.; LEE,J. J.; JIN, X. Cucurbitacin B inhibits the translational expression of hypoxia-induciblefactor-1 α . *Eur. J Pharmacol.* vol. 723, p. 46-54, **2014**.

MACEDO, L. P.M.; GUEDES, J. V. C.; GARCIA, J. F. Cucurbitacinas como fator de resistência a insetos-praga. *Revista Caatinga*, vol. 20, n. 2, p. 127-132, **2007**.

MACHADO, M. L. C.; PEREIRA, N. C.; MIRANDA, L. F.; TERENCE, M. C. Estudo das propriedades mecânicas e térmicas do polímero poli-3-Hidroxibutirato (PHB) e de Compósitos PHB/Pó de Madeira. *Polímeros*, vol. 20, n. 1, p.65-71, **2010**.

MAINARDES, R. M.; GREMIÃO, M. P. D.; EVANGELISTA, R. C. Thermoanalytical study of praziquantel-loaded PLGA nanoparticles. *Braz. J. Pharm. Sci.*, vol. 42, n. 4, **2006**.

MARQUES, F. A.; WENDLER, E. P.; MACEDO, A.; WOSCH, C. L.; MAIA, B. H. S.; MIKAMI, A. Y.; ARRUDA-GATTI, I. C.; PISSINATI, A.; MINGOTTE, F. L. C.; ALVES, A.; VENTURA, M. U. Response of *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae) to 1,4-Dimethoxybenzene and Analogs in Common Bean Crop. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, vol. 52, n. 6, p. 1333-1340, **2009**.

MARQUES, G. B. C.; ÁVILA, C. J.; PARRA, J. R. P. Danos causados por larvas e adultos de *Diabrotica speciosa* (COLEOPTERA: CHRYSOMELIDAE) em milho. *Pesq. Agropec. Bras.* vol. 34, n.11, p. 1983-1986, **1999**.

MARTIN, M. A.; MIGUENS, F.C.; RIEUMONT. J.; SANCHEZ, R. Tailoring of the external and internal morphology of poly-3-hydroxy butyrate microparticles. *Colloid Surface B*, vol. 17, p. 111-116, **2000**.

MATTEI,A.; LI, T.; Interplay between molecular conformation and intermolecular interactions in conformational polymorphism: A molecular perspective from electronic calculations of tolfenamic acid. *Int. J. Pharm.*, **2011**.

MIKAMI, A. Y.; VENTURA, M. U. Isca amilácea de cucurbitacina (*Lagenaria vulgaris* L.) promove maior eficiência do inseticida carbaril no controle de *Diabrotica speciosa*, em laboratório. *Ciência Rural* vol. 38, n. 8, p. 2119-2123, **2008**.

MLADENOVSKA, K.; CRUAUD, O.; RICHOMME, P.; BELAMIE, E.; RAICKI, R. S.; VENIER-JULIENNE, M. C.; POPOVSKI, E.; BENOIT, J. P.; GORACINOVA, K. 5-ASA loaded chitosan–Ca–alginate microparticles: Preparation and physicochemical characterization. *Int. J. Pharm.* vol. 345, p. 59-69, **2007**.

MODI, S.; KOELLING, K.; VODOVOTZ, Y. Assessing the mechanical, phase inversion, and rheological properties of poly-[(R)-3-hydroxybutyrate-co-(R)-3-hydroxyvalerate] (PHBV) blended with poly-(L-lactic acid) (PLA). *Eur. Polym. J.* vol. 49, p.3681-3690, **2013**.

MOEBUS,K.; SIEPMANN, J.; BODMEIER, R. Novel preparation techniques for alginate – poloxamer microparticles controlling protein release on mucosal surfaces. *Eur J Pharm Sci*, vol. 45, p. 358-366, **2012**.

MÜLLER, F. A. Ecologia de pragas de solo. Programa de Educação Tutorial da Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, **2003**.

MÜLLER, J. M.; DOS SANTOS, R. L.; BRIGIDO, R. V. Produção de alginato por micro-organismos. *Polímeros*, vol. 21, n.4, p.305-310, **2011**.

NG, S. M.; CHOI, J. Y.; HAN, H. S.; HUH, J. S.; LIM, J. O. Novel microencapsulation of potential drugs with low molecular weight and high hydrophilicity: Hydrogen peroxide as a candidate compound. *Int. J. Pharm.* vol. 384, p.120-127, **2010**.

PASPARAKIS, G.; BOUROPOULOS, N. Swelling studies and in vitro release of verapamil from calcium alginate and calcium alginate–chitosan beads. *Int J Pharm*, vol. 323, p. 34-42, **2006**.

PENG, S. W.; GUO, X. Y.; SHANG, G. G.; LI, J.; XU, X. Y.; YOU, M. L.; LI, P.; CHEN, G. Q. An assessment of the risks of carcinogenicity associated with polyhydroxyalkanoates through an analysis of DNA aneuploidy and telomerase activity. *Biomaterials*, vol. 32, p. 2546-2555, **2011**.

PEREIRA, M. R.; CRUZ, L.; RÉ, M. I.; GUTERRES, S. S. Micropartículas secas contendo fármaco modelo lipofílico preparadas a partir de suspensão aquosa: estudo de formulação. *Acta Farm. Bonaerense*, vol.25, p.198-205, **2006**.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R.; LOBO, J. S. Tecnologia Farmacêutica. 6 ed. Lisboa: Calouste Gulbenkian, **2003**.

QUISPE-CONDORI, S.; SALDAÑA, M. D. A.; TEMELLI, F. Microencapsulation of flax oil with zein using spray and freeze drying. *Food Sci. Technol.* vol. 44, n.9, p.1880-1887, **2011**.

RIBEIRO, A. J.; NEUFELD , R. J.; ARNAUD , P.; CHAUMEIL, J. C. Microencapsulation of lipophilic drugs in chitosan-coated alginate microspheres. *Int. J. Pharm.*, vol. 187, p. 115-123, **1999**.

RIEKES, M.K.; BARBOZA, F. M.; VECCHIA, D.D.; BOHATCH,M.; FARAGO,P. V.; FERNANDES, D.; SILVA, M. A. S.; STULZER, H.K. Evaluation of oral carvedilol microparticles prepared by simple emulsion technique using poly(3-hydroxybutyrate-

co-3-hydroxyvalerate) and polycaprolactone as polymers. *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 31, p. 962-968, **2011**.

RITGER, P. L.; PEPPAS, N. A. A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-Fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *J. Control. Release* vol. 5, p. 23-36, **1987**.

ROBERTO, S. R.; GENTA, W.; VENTURA, M. U. *Diabrotica speciosa* (Ger.) (Coleoptera: Chrysomelidae): New Pest in Table Grape Orchards. *Neotropical Entomology*, vol. 30, n. 4, p. 721 – 722, **2001**.

ROSA, D. DOS S.; PENTEADO, D. F.; CALIL, M. R. Propriedades térmicas e biodegradabilidade de PCL e PHB em Pool de fungos. *Ciência & Tecnologia* vol. 15, p. 75-80, **2000**.

ROUQUEROL; J.; AVNIR, D.; FAIRBRIDGE, C. W.; EVERETT, D. H.; HAYNES, J. H.; PERNICONE, N.; RAMSAY, J. D. F.; SING, K. S. W.; UNGER, K. K. Recommendations for the characterization of porous solids. *Pure Appl. Chem.* vol. 66, n.8, p.1739-1758, **1994**.

SACCHETIN, P. S. C.; MORAES, A. M.; LEAL, C. A. G.; FIGUEIREDO, H. C.P. Produção de micropartículas de alginato contendo *Flavobacterium columnare* inativada pelo método de emulsão para vacinação de peixes por via oral. *Quím. Nova* vol. 33, n. 2, p.263-268, **2010**.

SALLES, L. A. Eficiência do inseticida Thiamethoxam (ACTARA) no controle das pragas de solo da batata, *Diabrotica speciosa* (COL., CHRYSOMELIDAE) e *Heteroderes* spp. (COL., ELATERIDAE). *Rev. Bras. De Agrociência* vol. 6, n.2, p. 149-151, **2000**.

SANCHES, M. A.; ISHIMURA, I. Atratividade de sementes de “Taiuiá” (*Cayaponia tayuya* (Vell.) Cogn., Cucurbitaceae) a *Diabrotica* spp. (Coleoptera, Chrysomelidae), em acelga (*Beta vulgaris* L. var. cicla L., chenopodiaceae) na estação experimental

do instituto agrônomo, em São Roque, SP. *Arq. Inst. Biol.*, vol. 68, n. 2, p. 97-101, **2001**.

SANCHES, M. A.; ISHIMURA, I. Atratividade de sementes de “Taiuiá” (*Cayaponia tayuya* (Vell.) Cogn., Cucurbitaceae) a *Diabrotica spp.* (Coleoptera, Chrysomelidae), em acelga (*Beta vulgaris* L. var. cicla L., chenopodiaceae) na estação experimental do instituto agrônomo, em São Roque, SP. *Arq. Inst. Biol.*, vol. 68, n. 2, p. 97-101, **2001**.

SCHAFFAZICK, S.R.; GUTERRES, S.S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Quim. Nova*, vol. 26, p.726, **2003**.

SENHORINI, G. A.; ZAWADZKI, S. F.; FARAGO, P.V.; ZANIN, S. M. W.; MARQUES, F. A. Microparticles of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) loaded with andiroba oil: preparation and characterization. *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 32, p. 1121-1126, **2012**.

SHI, P.; HE, P.; THE, T. K. H.; MORSI, Y. S.; GOH, J. C. H. Parametric analysis of shape changes of alginate beads. *Powder Technol.* vol. 210, p.60-66, **2011**.

SILVA, C. M.; RIBEIRO, A. J.; FERREIRA, D.; VEIGA, F. Insulin encapsulation in reinforced alginate microspheres prepared by internal gelation. *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 29, p. 148-159, **2006**.

SILVA, C. M.; RIBEIRO, A. J.; FERREIRA, D.; VEIGA, F. Insulin encapsulation in reinforced alginate microspheres prepared by internal gelation. *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 29, p. 148-159, **2006**.

SILVA, C.; RIBEIRO, A.; FERREIRA, D.; VEIGA, F. Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. *Rev. Bras. Cien. Farm.*, vol. 39, n. 1, **2003**.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*, R. B. Alencastro, LTC, Rio de Janeiro, **2007**; 7ª edição, p.70-104.

SOLOMON, B.; SAHLE, F. F.; GEBRE-MARIAM, T.; ASRES, K.; NEUBERT, R. H. H. Microencapsulation of citronella oil for mosquito-repellent application: Formulation and *in vitro* permeation studies. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* vol. 80, n.1, p. 61-66, **2012**.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. Organic Chemistry. John Wiley & Sons, Inc., **2006**.

SQUIO, C. R.; ARAGÃO, G. M. F. Estratégias de cultivo para produção dos plásticos biodegradáveis poli(3-hidroxibutirato) e poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) por bactérias. *Quim. Nova*, vol. 27, n. 4, p. 615-622, **2004**.

STÜPP, J. J.; BOFF, M. I. C.; GONÇALVES, P. A. DE S. Manejo de *Diabrotica speciosa* com atrativos naturais em horta orgânica. *Hortic. Bras.* vol. 24, n.4, p.442-445, **2006**.

TEIXEIRA, V. G.; COUTINHO, F. M. B.; GOMES, A.S. Principais métodos de caracterização da porosidade de resinas à base de divinilbenzeno. *Quim. Nova*, vol.24, n.6, p. 808-818, **2001**.

TIBONE, A. Utilização de vidros porosos como armazenadores e liberadores de feromônios de insetos visando controle de pragas na agricultura. Curitiba, UFPR, **2007**. Dissertação Mestrado.

USP: United States Pharmacopeia. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 23 ed., p. 1703-1705, **1990**.

VALENTE, L. M. M. Cucurbitacinas e suas principais características estruturais. *Quim. Nova*. vol. 27, n.6, p.944-948, **2004**.

VERMER, M.; PATEL, A. V. Review of encapsulation methods suitable for microbial biological control agents. *Biol. Control*. vol. 67, p.380-389, **2013**.

VENTURA, M. U.; PEREIRA, T.; NUNES, D. H.; DE ARRUDA, I. C. Attraction of *Astylus variegatus* (Germ.) (Coleoptera: Melyridae) by Volatile floral attractants. *Sci. Agri*. vol. 64, n. 3, p.305-307, **2007**.

VENTURA, M. U.; RESTA, C. C. M.; NUNES, D. H.; FUJIMOTO, F. Trap attributes influencing capture of *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: chrysomelidae) on common bean fields. *Sci. Agric.*, vol. 62, n. 4, p. 351-356, **2005**.

WALSH, G. C. Distribution, host specificity, and overwintering of *Celatoria bosqi* Blanchard (Diptera: Tachinidae), a South American parasitoid of *Diabrotica* spp. (Coleoptera: Chrysomelidae: Galerucinae). *Biol. Control* vol. 29, p. 427-434, **2004**.

WANG, N.; ADAMS, G.; BUTTERY, L.; FALCONE, F. H.; STOLNIK, S. Alginate encapsulation technology supports embryonic stem cells differentiation into insulin-producing cells. *J. Biotechnol.* vol. 144, p.304-312, **2009**.

WENG, Y. X.; WANG, Y.; WANG, X. L.; WANG, Y. Z. Biodegradation behavior of PHBV films in a pilot-scale composting condition. *Polym. Test.*, vol. 29, p. 579-587, **2010**.

ZANIN, S. M. W.; MIGUEL, M. D.; CHIMELLI, M. C.; OLIVEIRA, A. B. Determinação do equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) de óleos de origem vegetal. *Visão Acadêmica* vol. 3, n.1. p. 13-18, **2002**.

ZANIN, S. M. W.; MIGUEL, M. D.; CHIMELLI, M.; DALMAZ, A. C. Parâmetros físicos no estudo da estabilidade das emulsões. *Visão Acadêmica* vol. 2, n. 2, p. 47-58, **2001**.

ZARBIN, P. H. G.; RODRIGUES, M. A. C. M.; LIMA, E. R. Feromônios de insetos: tecnologia e desafios para uma agricultura competitiva no Brasil. *Quim. Nova*. vol.32, n.3, p.722-731, **2009**.

ZARBIN, P.H.G, FERREIRA, J.T.B., LEAL, W.S. Metodologias gerais empregadas no isolamento e identificação estrutural de feromônios de insetos. *Quím. Nova*, v. 22, nº 2, p. 263-268, **1999**.